



CENTRO UNIVERSITÁRIO UNIVATES
PROGRAMA DE PÓS- GRADUAÇÃO STRICTO-SENSO
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA

**MODULAÇÃO EPIGENÉTICA DE GENES ENVOLVIDOS NA
PATOGENESE ONCO-HEMATOLÓGICA EM CULTURAS CELULARES
*IN VITRO***

Jayse Alves

Lajeado, fevereiro de 2017

Jayse Alves

**MODULAÇÃO EPIGENÉTICA DE GENES ENVOLVIDOS NA
PATOGENESE ONCO-HEMATOLÓGICA EM CULTURAS CELULARES
*IN VITRO***

Dissertação apresentada no Programa de Pós Graduação em Biotecnologia do Centro Universitário UNIVATES, como parte da exigência para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Ana Lúcia Abujamra

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Márcia Inês Goetttert

Lajeado, fevereiro de 2017

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à Deus por me guiar e dar proteção para seguir em frente com os meus objetivos sem desanimar frente às dificuldades. Por ter colocado pessoas especiais na minha vida as quais auxiliaram de alguma forma nesta conquista.

À toda minha família, em especial aos meus pais, Plauto e Fátima, que muitas vezes abdicaram dos seus próprios sonhos para que os nossos se realizassem. Por todo amor e carinho, por acreditarem na minha capacidade, apoiar minhas escolhas tornando possível a realização do mestrado e, por mostrarem o quão infinito é o amor. Devo tudo que sou graças a vocês!

Ao meu namorado, Luiz, por todo seu amor, carinho, incentivo e compreensão desde a graduação. Obrigada por ser essa pessoa fundamental e incrível em minha vida, compreender minhas ausências nesse período e por estar ao meu lado neste momento tão importante!

À professora Dr^a Ana Lúcia Abujamra, minha orientadora, pela disponibilidade, confiança em mim depositada, suporte, incentivo e pelo aprendizado adquirido. Te agradeço por ser uma orientadora paciente e amiga. Agradeço também minha co-orientadora, professora Dr^a Márcia Inês Goetttert, sempre prestativa, dedicada e disponível, obrigada pelo apoio e contribuição para realização deste trabalho.

Ao corpo docente, coordenação e funcionários do Programa de Pós Graduação em Biotecnologia do Centro Universitário UNIVATES, pelos ensinamentos compartilhados e pela estrutura de apoio.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa PROSUP de estudos. À UNIFESP pela doação das linhagens celulares e a ONCOSINOS pela doação dos quimioterápicos utilizados neste estudo.

As gurias do grupo de pesquisa em doenças onco-hematológicas, Laura e Gê pelo auxílio nos experimentos, troca de ideias e auxílio no decorrer desta etapa. Devo muito a vocês. Obrigada pela amizade e companheirismo e por tornar esta jornada mais muito agradável e divertida.

Ao professor Drº Vanderlei Biolchi pela contribuição com a análise estatística. Ao pessoal do Laboratório de Cultura de Células, de Biologia Molecular e Biotecnologia, pelo convívio, colaboração e troca de experiências.

À todos que de uma forma ou outra, ajudaram na realização desse trabalho, meu muito obrigada! Com vocês divido a alegria desta experiência.

RESUMO

Doenças onco-hematológicas são um grupo heterogêneo de neoplasias, originadas da expansão clonal de uma célula da linhagem linfóide ou mieloide, com capacidade proliferativa e auto-replicativa aumentada, e que possuem alta morbi-mortalidade no Brasil e no mundo. De acordo com o Instituto Nacional do Câncer, neoplasias malignas têm constituído um sério problema de saúde pública e, apesar das evoluções no tratamento, a maioria dos pacientes tem sua qualidade de vida comprometida e futuro incerto quanto a possíveis recidivas da doença. Assim, estudos sobre os mecanismos moleculares destas doenças são fundamentais para o desenvolvimento de terapias eficazes, rápidas e seletivas, visto que poucas estratégias terapêuticas têm sucesso em serem eficazes sem desencadear toxicidades ou efeitos tardios debilitantes. O presente estudo teve por objetivo verificar alterações na expressão de genes envolvidos no fenótipo maligno de doenças onco-hematológicas, mediante ao tratamento com quimioterápicos clássicos e agente desmetilante decitabina. Para realização dos experimentos, foram utilizadas as linhagens celulares KASUMI-1 (leucemia mieloide aguda), K-562 (leucemia mieloide crônica) e RAJI (linfoma não Hodgkin). As células foram plaqueadas a uma densidade de 3×10^4 células/poço e tratadas com diferentes concentrações de diferentes quimioterápicos utilizados na clínica. Após 24 e 48 horas de tratamento, foi avaliado o crescimento, a viabilidade e a sobrevivência celular e, na última avaliação, foi feita a extração de RNA total das células. A síntese de cDNA foi realizada com 100 ng de RNA e a expressão gênica dos genes *IDH2*, *TET2*, *EZH2*, e *KDM2B* foi avaliada através de qPCR utilizando o gene da actina e GAPDH como controle de expressão. Foi possível observar modulação da expressão gênica antes de mudança de fenótipo na cultura celular para os genes testados nos quimioterápicos utilizados. Ainda, foi possível demonstrar que existe uma diferença entre a associação do quimioterápico com a decitabina isolada. Os genes testados podem apresentar um possível potencial como biomarcadores em resposta e acompanhamento de tratamento de doenças onco-hematológicas.

Palavras chave: biomarcadores, doenças onco-hematológicas, expressão gênica, modulação epigenética

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema ilustrativo da diferenciação hematopoiética	21
Figura 2 - Hematopoiese normal e leucêmica	23
Figura 3 - Cariótipo de um paciente com leucemia mieloide crônica	27
Figura 4 – Formação do cromossomo Philadelphia	28
Figura 5: Descrição resumida da metodologia empregada no estudo	41
Figura 6 a 8 – Curva de dose para o agente desmetilante decitabina na linhagem KASUMI-1, K-562, RAJI	43 a 44
Figura 9 a 13- Avaliação da proliferação celular através do método de Azul de Tripan na linhagem KASUMI-1	45 a 47
Figura 14 a 18 - Avaliação da proliferação celular através do método de Azul de Tripan na linhagem K-562	48 a 50
Figura 19 a 23 - Avaliação da proliferação celular através do método de Azul de Tripan na linhagem RAJI	51 a 53
Figura 24 - Avaliação da expressão gênica de EZH2 na linhagem K-562.....	55
Figura 25 - Avaliação da expressão gênica de EZH2 na linhagem RAJI	56
Figura 26 - Avaliação da expressão gênica de IDH2 na linhagem KASUMI-1	57

Figura 27 - Avaliação da expressão gênica de IDH2 na linhagem K-562	59
Figura 28 - Avaliação da expressão gênica de IDH2 na linhagem RAJI	60
Figura 29 - Avaliação da expressão gênica de TET2 na linhagem K-562	61
Figura 30- Avaliação da expressão gênica de TET2 na linhagem RAJI.....	62
Figura 31 - Avaliação da expressão gênica de KDM2B na linhagem KASUMI-1	63
Figura 32 - Avaliação da expressão gênica de KDM2B na linhagem K-562....	64
Figura 33 - Avaliação da expressão gênica de KDM2B na linhagem RAJI.....	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Linhagens celulares utilizadas	34
Tabela 2 - Meios utilizados na manutenção das linhagens celulares	35
Tabela 3 – Fármacos utilizado	36
Tabela 4 – <i>Primers</i> utilizados.....	37
Tabela 5 - Quantidade de reagentes padronizada e utilizada para cada reação de qPCR dos genes de interesse para linhagem RAJI e K-562	39
Tabela 6 - Quantidade de reagentes padronizada e utilizada para cada reação de qPCR dos genes de interesse para linhagem KASUMI-1	40
Tabela 7 - Resultados encontrados na expressão gênica dos genes estudados na linhagem KASUMI-1, na associação de decitabina com cada um dos quimioterápicos descritos	83
Tabela 8 - Resultados encontrados na expressão gênica dos genes estudados na linhagem K-562, na associação de decitabina com cada um dos quimioterápicos descritos	84
Tabela 9 - Resultados encontrados na expressão gênica dos genes estudados na linhagem RAJI, na associação de decitabina com cada um dos quimioterápicos descritos	84

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ARA-C - Citarabina

cDNA - DNA complementar

Células NK – Células Natural Killer

DEPC – Dietilpirocarbonato

DMSO – Dimetil Sulfóxido

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

dNTP's - Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

DP – Desvio Padrão

EZH2 – potenciador do homólogo zeste 2

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

IDH2 - Isocitrato Desidrogenase 2

INCA – Instituto Nacional do Câncer

KDM2B – Lisina Desmetilase 2B

LH – Linfoma Hodgkin

LLA – Leucemia Linfóide Aguda

LMA – Leucemia Mieloide Aguda

LMC – Leucemia Mieloide Crônica

LMMC – Leucemia Mielomonocítica Crônica

LNH – Linfoma não Hodgkin

MTX – Metotrexato

OMS – Organização Mundial da Saúde

PET-TC – Tomografia Computadorizada por Emissão de Pósitrons

qPCR – Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real

RNA - Ácido Ribonucleico

SFB – Soro Fetal Bovino

SMD- Síndrome Mielodisplásica

TET2 – Metilcitosina Desoxigenase 2

TKI – Inibidores da Tirosina Cinase

VCR- Vincristina

VP-16 – Etoposídeo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1 Problema	16
1.2 Objetivos	17
1.2.1 Objetivo Geral	17
1.2.2 Objetivos Específicos	17
1.2.3 Justificativa.....	18
 2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	 20
2.1 Leucemias.....	21
2.1.1 Leucemia Mieloide Aguda	22
2.1.2 Leucemia Mieloide Crônica	25
2.2 Linfomas	29
2.2.1 Linfoma Não-Hodgkin	30
2.3 Eventos epigenéticos como marcadores em doenças onco-hematológicas	32
 3. PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS.....	 34
3.1 Tipo de Pesquisa	34
3.2 Local de pesquisa	34
3.3 Linhagens celulares	34

3.4 Protocolo de cultivo das células.....	35
3.4.1 Crescimento e mantimento da cultura celular.....	35
3.4.2 Congelamento e descongelamento das células.....	35
3.5 Origem, preparo e dose dos fármacos e compostos estudados	36
3.5.1 Fármacos utilizados neste estudo	36
3.5.2 Estabelecimento de curvas de dose dos fármacos.....	36
3.6 Avaliação do crescimento, da viabilidade e da sobrevivência celular	37
3.6.1 Crescimento e citotoxicidade celular – contagem	37
3.7 Avaliação epigenética e de expressão gênica.....	37
3.7.1 Extração do RNA total.....	38
3.7.2 Quantificação do RNA.....	38
3.7.3 Síntese de cDNA.....	39
3.7.4 PCR em tempo real.....	39
3.8 Análise Estatística.....	41
3.9 Considerações Éticas	42
 4. RESULTADOS.....	 43
4.1 Avaliação da proliferação celular através do método de Azul de Tripan.....	43
4.1.1 Linhagem KASUMI-1 (Leucemia Mieloide Aguda).....	44
4.1.2 Linhagem K-562 (Leucemia Mieloide Crônica)	47
4.1.3 Linhagem RAJI (Linfoma não Hodgkin)	50
4.2 Avaliação da expressão gênica	54
4.2.1 Avaliação da expressão gênica de <i>EZH2</i>	54
4.2.1.1 Linhagem K-562.....	54
4.2.1.2 Linhagem RAJI	55
4.2.2 Avaliação da expressão gênica de <i>IDH2</i>	57
4.2.2.1 Linhagem KASUMI-1	57
4.2.2.2 Linhagem K-562.....	58

4.2.2.3 Linhagem RAJI	59
4.2.3 Avaliação da expressão gênica de <i>TET2</i>	60
4.2.3.1 Linhagem K-562.....	60
4.2.3.2 Linhagem RAJI	62
4.2.4 Avaliação da expressão gênica de <i>KDM2B</i>	63
4.2.4.1 Linhagem KASUMI-1	63
4.2.4.2 Linhagem K-562.....	64
4.2.4.3 Linhagem RAJI	65
 5. DISCUSSÃO	 67
 6. CONCLUSÃO	 85
 REFERÊNCIAS.....	 87

1. INTRODUÇÃO

De acordo com dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), neoplasias malignas têm constituído um sério problema de saúde pública. As estimativas de novos casos para o biênio 2016-2017 chegam a 596.070, sendo destes 300.870 para mulheres e 295.200 para homens. Deste total, 10.070 são casos de leucemia, sendo 5.540 para homens e 4.530 para mulheres, valores que correspondem a um risco estimado de 5,63 novos casos a cada 100 mil homens e 4,38 para cada 100 mil mulheres. Para o linfoma não Hodgkin estimam-se 10.240 novos casos, sendo 5.210 casos em homens e 5.030 em mulheres, correspondendo a um risco estimado de 5,27 novos casos a cada 100 mil homens e 4,88 para cada 100 mil mulheres. A estimativa para o linfoma de Hodgkin chega a 2.470 novos casos, sendo 1.460 homens e 1.010 mulheres, valores que correspondem a um risco estimado de 1,46 novos casos a cada 100 mil homens e 0,93 para cada 100 mil mulheres (INCA, 2015).

Em relação aos dados de mortalidade no Brasil, os relatos mais recentes, de 2013, informam que 6.316 pessoas vieram a óbito em decorrência de algum tipo de leucemia; 536 pessoas em virtude de linfoma de Hodgkin e 4.154 pessoas em decorrência de linfoma não Hodgkin (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013). Dessa forma, pode-se observar que mesmo tendo menor incidência que outras neoplasias, as doenças onco-hematológicas apresentam alta mortalidade (INCA, 2015).

Com o objetivo de reduzir estes dados e as incapacidades causadas por estas doenças, bem como contribuir para a melhoria da qualidade de vida dos pacientes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014), o governo federal vem investindo um grande

montante no Programa Nacional de Controle do Câncer. Este programa inclui metas de detecção precoce, cura e prolongamento da vida dos pacientes, além da melhora da qualidade de vida. Atualmente, as principais formas de tratamento englobam as cirurgias e radioterapias, que são apropriadas para o tratamento de doenças ainda localizadas e regionais, com um papel mais limitado no câncer em estágios avançados; e a quimioterapia, a qual tem a capacidade de curar alguns tipos de câncer disseminados (INCA, 2016), como os que serão abordadas neste trabalho.

O Programa Nacional de Controle do Câncer vem em boa hora. No ano de 1999, o governo federal gastou R\$ 87 milhões em cirurgias oncológicas, e, em 2010, este valor quase dobrou, atingindo a marca de R\$ 173,19 milhões. Os gastos em radioterapia passaram de R\$ 77 milhões no ano de 1999, para 209,53 milhões em 2010. E os gastos com quimioterapia foram de R\$ 306 milhões em 1999, e de R\$ 1,473 bilhões após onze anos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011). Em 2013, R\$ 2,84 bilhões foram aplicados em tratamentos oncológicos, incluindo cirurgias, quimioterapias e radioterapias (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). Em 2014, o investimento foi de R\$ 2,07 bilhões para quimioterapia e radioterapia e 4,19 milhões para cirurgias oncológicas, totalizando 2,074 bilhões (MENDONÇA, 2015).

Com base nestas informações, este estudo abordará a leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia mieloide crônica (LMC) e o linfoma não Hodgkin (LNH), doenças de difícil diagnóstico pelo fato dos sintomas gerais, tais como febre, perda de peso e manchas no corpo, serem confundidos com os de outras patologias (MALTA, SCHALL, MODENA, 2008). Além disso, a presença de outras morbidades, como hipertensão, aterosclerose, diabetes e doenças senis, além de algum comprometimento hepático e renal, que devem ser levados em consideração na escolha no tratamento, dificultam a terapêutica (PETTIT, ODENIKE, 2015). Outro fato relevante é a hora do diagnóstico; quanto mais tarde for feito, mais disseminada encontra-se a doença e, dessa forma, as chances de cura são menores, além de serem maiores as sequelas decorrentes de um tratamento mais agressivo (MALTA, SCHALL, MODENA, 2008).

Outro problema refere-se à mudança de fenótipo destas doenças ao longo do tratamento. Cerca de 20-30% dos pacientes sofrem recidivas, onde é comum encontrar alterações genéticas na mesma linhagem das células originais. Entretanto,

ainda existe um evento chamado "*lineage switching*", no qual leucemias agudas mudam de linhagem (linfoide ou mieloide) entre o momento do diagnóstico inicial até a recidiva. Uma recidiva precoce está associada a uma maior taxa de não-resposta ao tratamento, uma menor duração da segunda remissão completa, e uma menor taxa de sobrevida livre de eventos. A maioria das recaídas em LMA ocorre durante o tratamento no primeiro ano após o diagnóstico. Este fenômeno pode ocorrer devido a uma seleção clonal, pois a quimioterapia erradica o clone dominante presente no diagnóstico, permitindo assim a expansão de um clone secundário com um fenótipo diferente. A grande maioria dos casos envolve a conversão de Leucemia Linfoide Aguda (LLA) para LMA, e os casos de conversão de LMA para LLA são extremamente raros. Várias hipóteses tentam explicar a conversão da linhagem em leucemia aguda, mas o seu mecanismo exato ainda não está claro. Modificações epigenéticas podem ser importantes na regulação de conversões do fenótipo celular em resposta a mudanças no microambiente. Acredita-se que atividades genéticas e epigenéticas estejam diretamente implicadas no redirecionamento das linhagens, já que modificações que afetam a estrutura da cromatina são importantes para a expressão de genes envolvidos nas decisões do destino celular e na manutenção do estado de diferenciação celular (DORANTES-ACOSTA, PELAYO, 2012).

1.1 Problema

Apesar das recentes evoluções no tratamento das doenças onco-hematológicas, incluindo um aumento no índice de cura de algumas variantes genéticas de LMA, LMC e do LNH, e de um aumento do período de remissão pós-tratamento, a maioria dos pacientes ainda tem sua qualidade de vida comprometida, com expectativa de vida diminuída, e um futuro incerto quanto a possíveis recidivas da doença (LIN et al., 2016; ROSSI et al., 2015; CASTAIGNE et al., 2012; LARSON, 2012).

A primeira limitação do tratamento quimioterápico reside na toxicidade causada durante o tratamento, ou seja, a toxicidade aguda. A necessidade de diminuir a dose recomendada de quimioterapia, ou até mesmo de interromper o tratamento, significa um pior prognóstico ao paciente, pois, no momento de diminuição de dose ou de interrupção de tratamento, restam em circulação as células malignas mais resistentes,

que até então não haviam sido eliminadas. Com a suspensão do tratamento, ou diminuição de dose, essas células encontram um ambiente mais permissivo para sua sobrevivência e eventual reprodução, e, frequentemente, esses eventos envolvem a seleção de clones mais resistentes ao tratamento. Invariavelmente, quando o paciente se torna apto a receber o tratamento novamente, a resposta terapêutica tende a ser menor (TAKAHASHI et al., 2015; SNOWDEN et al., 2015).

Além disso, a variabilidade na resposta tumoral aos diferentes fármacos é atualmente o maior problema na prática clínica e no desenvolvimento de novos agentes anti-neoplásicos. Considerando que os fatores genéticos podem influenciar fortemente a resposta individual e tumoral aos fármacos, pesquisas relacionadas à expressão gênica e terapias alvo-moleculares têm sido cada vez mais estimuladas e, atualmente, são responsáveis pelos resultados mais impactantes no tratamento do câncer.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo Geral

Verificar alterações na expressão de genes envolvidos na regulação epigenética ou que favoreçam o fenótipo maligno de doenças onco-hematológicas utilizando células da linhagem linfóide e mieloide e reagentes disponíveis comercialmente.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Padronizar condições de crescimento em cultura de três linhagens celulares das doenças onco-hematológicas: KASUMI-1 para leucemia mieloide aguda, K-562 para leucemia mieloide crônica e RAJI para linfoma não Hodgkin;
- Observar a cinética de crescimento das linhagens celulares antes, durante e após o tratamento com quimioterápicos clássicos, com o agente desmetilante decitabina, e sua combinação;

- Verificar se é possível modular a expressão gênica mediante tratamento com quimioterápicos utilizados no tratamento destas afecções e com o agente desmetilante decitabina;

- Caracterizar a expressão gênica dos genes *IDH2*, *TET2*, *EZH2* e *KDM2B* nas linhagens celulares KASUMI-1, K-562 e RAJI;

1.2.3 Justificativa

A elevada incidência de câncer na população humana tem motivado pesquisadores ao redor do mundo na busca de potenciais alvos terapêuticos e marcadores prognósticos e diagnósticos, bem como tratamentos mais eficazes e custo-efetivos, sem os efeitos colaterais e tardios que, muitas vezes, são incapacitantes. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), nas próximas décadas, o câncer será a primeira causa de mortalidade no mundo. Associado a esse fato, possui um forte impacto na sociedade, debilitando indivíduos produtivos, tanto no âmbito social quanto econômico, além de constituir um sério problema de saúde pública. Por estes motivos, os estudos sobre os mecanismos moleculares do câncer são fundamentais para o desenvolvimento de terapias eficazes, rápidas e seletivas. Devido à grande variabilidade nos tipos de tumores existentes, cujas características morfológicas, genótípicas, fisiológicas e de invasão tecidual são distintas, faz-se necessário uma abordagem de tratamento multidirecional, empregando-se drogas quimioterápicas citotóxicas com diferentes mecanismos de ação.

Com isso, houve um grande crescimento nas pesquisas relacionadas as neoplasias e o surgimento de uma grande quantidade de informações, tornando-se fundamental a identificação de resultados provenientes da ciência básica com relevância suficiente para tornar a translação para a prática clínica desejável e compensadora. Para isso, é crítico o estudo de intervenções farmacológicas em modelos experimentais através da combinação de técnicas de biologia molecular, celular, e da genética.

As doenças onco-hematológicas são doenças especialmente interessantes nesse contexto, visto que, até o momento, pouquíssimas estratégias terapêuticas têm

sucesso em serem eficazes sem desencadear toxicidades agudas, graves ou efeitos tardios debilitantes.

Levando em consideração estas informações, além do fato do câncer ser uma doença crônica não transmissível, com altos custos nos tratamentos para doenças onco-hematológicas e com efeitos tardios desencadeados pelos tratamentos, é plausível explorar os aspectos moleculares destas patologias, e dos tratamentos disponíveis. Almeja-se a descoberta de marcadores de progressão de doença, bem como de alterações epigenéticas que podem predispor certos pacientes a progressão da doença e/ou eventos secundários graves, a fim de tornar esses tratamentos mais custo-efetivos e eficazes, melhorando a qualidade de vida dos pacientes tratados para essas patologias.

Em função de já haver relatos de mudanças genótípicas e fenotípicas em células tumorais durante o tratamento oncológico (MAESHIMA et al., 2013; FERREL et al., 2016; GAHLAUT et al., 2016), e que eventos epigenéticos precedem essas mudanças, elucidar os mecanismos epigenéticos desencadeados por quimioterápicos é de extrema importância para alicerçar o desenvolvimento de novos protocolos terapêuticos, cujas combinações de drogas mostram-se cada vez mais eficazes em evitar a progressão do crescimento tumoral, ao mesmo tempo diminuindo os efeitos colaterais clínicos. Através da avaliação epigenética, será possível verificar a expressão de genes importantes para o fenótipo maligno, bem como sua modulação. Esse padrão poderá ser avaliado futuramente como um possível marcador prognóstico em estudos de sobrevida livre de doença e sobrevida global, bem como marcadores de risco de progressão para eventuais recidivas ou para a ocorrência de uma segunda neoplasia.

Propõe-se uma estratégia utilizando como modelo células cultivadas em laboratório e ferramentas de biologia celular e molecular, para caracterizar alterações na expressão gênica de quatro genes chave na patogênese das afecções onco-hematológicas, a fim de identificar não somente novos alvos terapêuticos, mas também marcadores de prognóstico e progressão de doença.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

A hematopoiese é o processo de formação, desenvolvimento e maturação das células primordiais ou precursoras das células sanguíneas, sistema que mantém a renovação celular contínua (FIGURA 1) (LORENZI et al., 2003). Quando ocorre um estresse a nível hematopoiético, ocorrem modificações na taxa e no padrão de produção de certo tipo celular, como acontece nas doenças onco-hematológicas.

As doenças onco-hematológicas são um grupo heterogêneo de neoplasias (RECH, 2005), que surgem da expansão clonal de uma célula da linhagem linfóide ou mieloide, com capacidade proliferativa e auto-replicativa aumentada (HARRIS et al., 1994; VARDIMAN et al., 2009). Essa expansão ocorre nas células precursoras, as células-tronco hematopoiéticas, as quais podem estar comprometidas à linhagem linfóide ou mieloide (WANG, WAGERS, 2011). Em decorrência, ocorre um aumento das células imaturas, incapazes de realizar sua função, levando a citopenia, um dos mais frequentes sinais clínicos destas doenças (EPPERT et al., 2011).

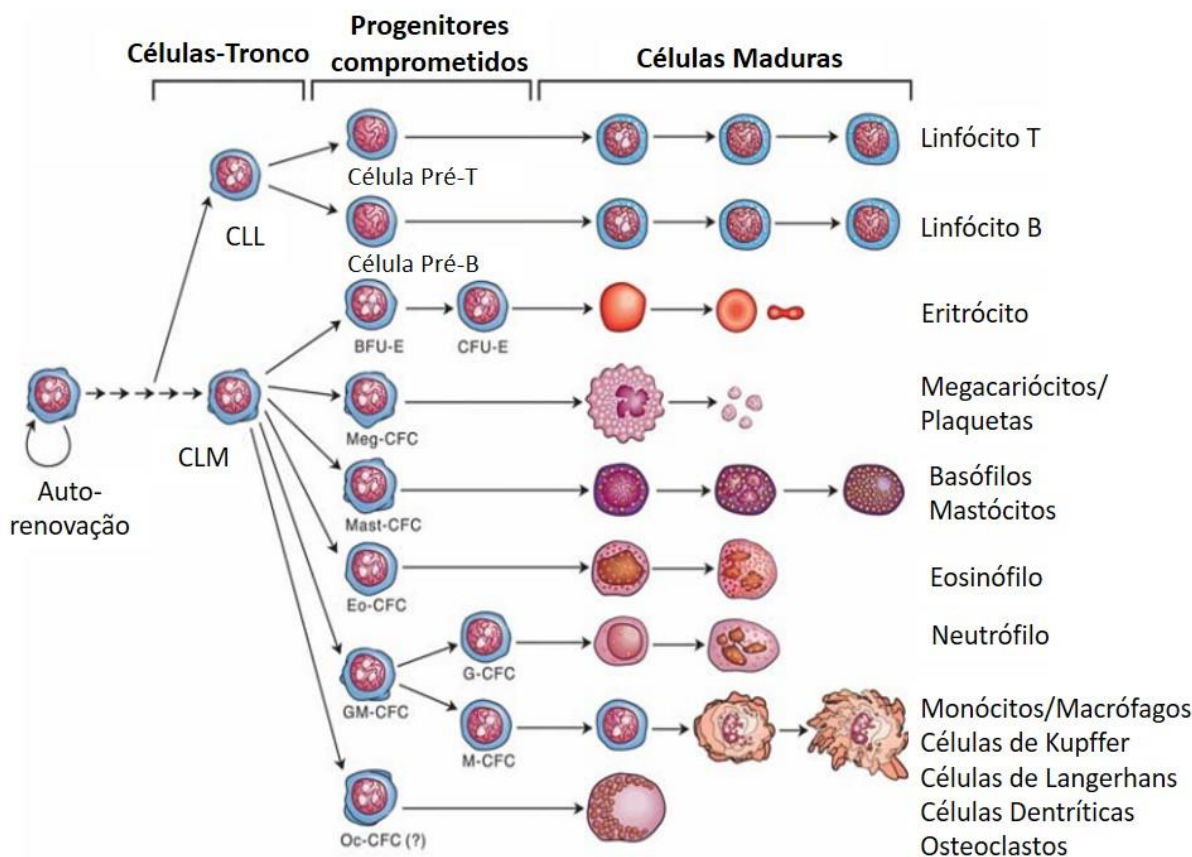


Figura 1: Esquema ilustrativo da diferenciação hematopoiética – uma célula tronco multipotente divide-se em uma célula tronco (auto renovação) e uma célula progenitora comprometida com a linhagem linfóide (CLL) e mieloide (CLM). As células progenitoras entram em ciclos de proliferação e diferenciação, tornando-se mais especializadas a cada ciclo e gerando todas as células sanguíneas maduras. BFU-E CFU-E: unidades formadoras de colônias de eritrócitos; Meg-CFC: células formadoras de colônias de megacariócitos; Mast-CFC: células formadoras de colônias de mastócitos; Eo-CFC: células formadoras de colônias de eosinófilos; GM-CFC: células formadoras de colônias de macrófagos e granulócitos; G-CFC: células formadoras de granulócitos; M-CFC: Células formadoras de colônias de macrófagos; Oc-CFC: células formadoras de colônias de osteoclastos.

Fonte: Adaptado de Santos, 2009

2.1 Leucemias

Leucemias são um grupo de patologias caracterizadas pela proliferação desregulada de alguma célula hematopoiética na medula óssea. Com isso, a célula leucêmica consegue crescer mais do que os elementos normais encontrados no sangue (RAPAPORT, 1990).

As leucemias podem ser divididas de acordo com a evolução da doença, sendo caracterizadas como crônica ou aguda. As crônicas são caracterizadas por se agravarem lentamente, porém são mais difíceis de curar (HOFFBRAND, MOSS, PETTIT, 2006). Na leucemia aguda, a doença se agrava rapidamente (INCA, 2016), geralmente sendo doenças mais agressivas nas quais a transformação maligna acontece nas células tronco da hematopoiese ou nos genitores primitivos. Combinando estas duas classificações, as leucemias se subdividem de acordo com os leucócitos as quais atacam: da linhagem linfoide ou mieloide (HOFFBRAND, MOSS, PETTIT, 2006). As neoplasias linfoides incluem a leucemia linfoide aguda e crônica e as neoplasias mieloides incluem a leucemia mieloide aguda, crônica e a síndrome mielodisplásica (SMD) (RECH, 2005).

2.1.1 Leucemia Mieloide Aguda

A LMA é uma desordem caracterizada pela proliferação descontrolada de mieloblastos que se acumulam na medula óssea e no sangue periférico. Esta proliferação acarreta um elevado nível de células malignas e imaturas e uma produção anormal de plaquetas e eritrócitos (FIGURA 2) (KHWAJA et al., 2016). Como consequência, o número de células normais diminui, levando à anemia, trombocitopenia e neutropenia (NIETO et al., 2016). Pacientes de todas raças, sexos e faixas etárias podem apresentar a doença, porém é tipicamente encontrada em adultos com idade superior a 60 anos e sua incidência aumenta com a idade (KHALED, MALKI, MARCUCCI, 2016; VERA-AGUILERA et al., 2016).

De acordo com a OMS, a LMA pode ser dividida em quatro grupos: LMA com alterações relacionadas à mielodisplasia, LMA relacionada com a quimioterapia ou radioterapia anteriores, LMA com cariótipo normal e LMA com anormalidades genéticas, onde ocorrem inversão ou translocação dos cromossomos 3 e 16 e/ou as seguintes translocações: t(8:21), t(9:11), t(6:9), t(15:17) e t(1:22) (OMS, 2016). Seu desenvolvimento pode ocorrer de maneira primária ou secundária. A primária ocorre quando o paciente adquire a doença pela primeira vez (*de novo*), e na secundária, a LMA se desenvolve a partir de mielodisplasia e/ou outras doenças hematológicas, como as síndromes mieloproliferativas, ou quando sucede a tratamento prévio com quimioterapia (LORENZI et al., 2003; HOFFBRAND, MOSS, PETTIT, 2006).

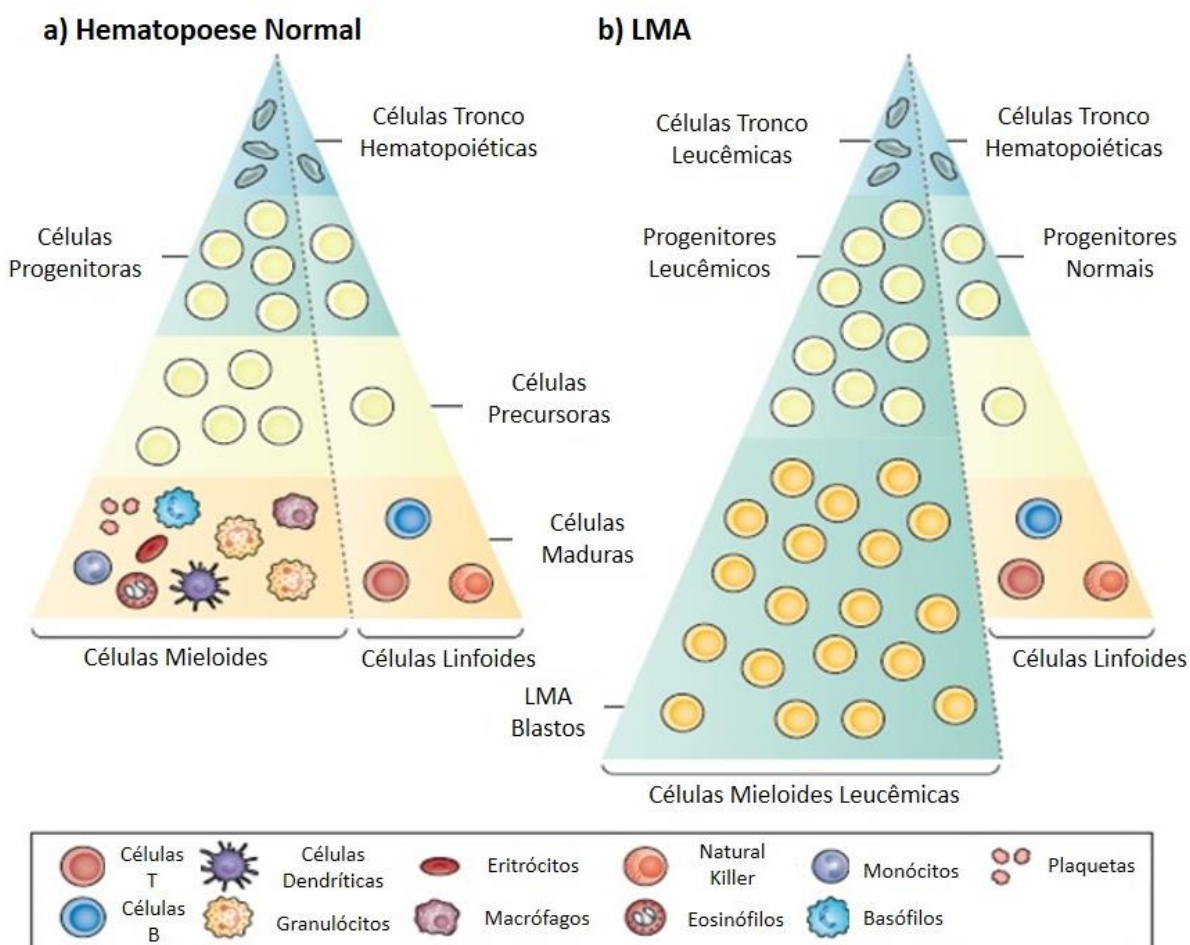


Figura 2: Hematopoiese normal e leucêmica. a) Demonstração da estrutura hierárquica geral da hematopoiese normal. As células tronco hematopoiéticas, possuem grande capacidade de renovação e dão origem a várias células progenitoras hematopoiéticas, as quais também possuem capacidade proliferativa, porém perdem a capacidade de auto-renovação e estão comprometidas com uma ou mais linhagens celulares. Os progenitores produzem diferentes células precursoras e diferentes tipos de células hematopoiéticas já maduras. b) Demonstração da alteração da hematopoiese na LMA. As células tronco hematopoiéticas encontram-se no topo do desenvolvimento da pirâmide, dando origem as células progenitoras da LMA e as células blásticas mielóides mais maduras, porém ainda morfologicamente primitivas. A linfopoiese permanece relativamente preservada.

Fonte: adaptado de Khwaja et al., 2016

Condições hereditárias ou congênitas, como a Síndrome de Down e de Bloom, anemia de Fanconi e neutropenia congênita, além de mutações germinativas, têm sido associadas a maior predisposição para LMA (KHALED, MALKI, MARCUCCI, 2016). Sabe-se, também, que seu risco de desenvolvimento aumenta pela exposição à agentes que danificam o Ácido Desoxirribonucleico (DNA), como os presentes no

cigarro, exposição à radiação ionizante, benzeno e quimioterapia citotóxica. Além disso, quimioterápicos da classe de agentes alquilantes e inibidores da topoisomerase II estão relacionados com sua incidência (KHWAJA et al., 2016).

Normalmente, os sintomas apresentam início rápido, atribuído pela falência da medula óssea (caso não haja precedência da SMD) (KHWAJA et al., 2016), e, se não for tratada rapidamente, os pacientes morrem de infecção ou hemorragia em questão de semanas (TALLMAN, GILLILAND, ROWE, 2005). Sua apresentação clínica está diretamente relacionada com a citopenia (NIETO et al., 2016). Os pacientes normalmente apresentam sinais e sintomas de fadiga, mal-estar, perda de apetite, falta de ar aos esforços devido à anemia, hemorragias e hematomas devido à trombocitopenia, infecções frequentes e persistentes devido à neutropenia, além de dor óssea (SANZ et al., 2016; KHWAJA et al., 2016).

O diagnóstico é realizado com base nos sinais clínicos apresentados pelo paciente e por exames de sangue (hemograma), biópsia da medula óssea, mielograma, testes de imunofenotipagem, Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR), caracterização citogenética e molecular de mieloblastos (utilizados para distinguir a LMA de outros tipos de leucemia e para definir seus subtipos). O achado mais comum no sangue destes pacientes é a alteração nas três linhagens celulares: eritrócitos, neutrófilos e plaquetas; presença de >20% de mieloblastos no sangue periférico com contagem mínima de 200 leucócitos e de 500 para medula óssea; anemia e trombocitopenia (KHWAJA et al., 2016; HASSERJIAN, 2013).

Tipicamente, o tratamento é dividido em três fases: indução à remissão, consolidação e manutenção. Na indução à remissão utiliza-se quimioterapia citotóxica para eliminar as células leucêmicas de circulação e da medula óssea até alcançar a remissão completa da doença. Na terapia de consolidação, o objetivo é eliminar as células malignas residuais, com intensidade semelhante ou menor do que a terapia de indução, exceto em casos de transplante de medula óssea. A terapia de manutenção varia conforme o bem-estar geral do paciente e sua idade (KHWAJA et al., 2016).

Atualmente, a terapia padrão para pacientes portadores de LMA é a

combinação de quimioterápicos, geralmente uma antraciclina e citarabina (ARA-C), visando alcançar uma remissão completa e prolongamento da sobrevivência do paciente (SANZ et al., 2016), por atuarem nas células que se encontram em períodos celulares ativos, realizando ativamente a síntese de DNA e Ácido Ribonucleico (RNA) (LORENZI et al., 2003). O padrão de tratamento para os pacientes é nomeado “3+7”, o qual inclui 3 dias de tratamento com antraciclina combinado com 7 dias de tratamento de ARA-C. Em torno de 70 a 80% dos pacientes com idade inferior a 60 anos conseguem uma remissão completa ao fazer uso dessa combinação (SANZ et al., 2016). Porém, pacientes mais idosos e aqueles que apresentam comorbidades, muitas vezes são considerados inelegíveis para terapia de indução padrão e suas opções de tratamento são guiadas pela biologia da doença, estado de desempenho, e a presença de comorbidades, como, por exemplo, doença cardiovascular, pulmonar, hepática, cerebrovascular e disfunção renal, o que certamente limita a eficácia da terapia ou a capacidade do paciente para tolerar a citotoxicidade da indução da quimioterapia (NIETO et al, 2016; HASSERJIAN, 2013). De acordo com Sanz et al. (2016), cerca de 50% dos pacientes mais idosos capazes de receber quimioterapia intensa alcançam uma remissão completa, porém, enfrentam uma taxa de recaída muito mais elevada ao serem comparados com pacientes mais jovens, e as taxas de sobrevivência para este grupo são baixas (SANZ et al., 2016).

Sabe-se que, durante a terapia, a qualidade de vida dos pacientes é baixa. Após a remissão e interrupção da terapia, a maioria dos pacientes mais jovens voltam a ter uma vida consideravelmente normal. Contudo, em idosos, a terapia pode ser devastadora, o que mostra a importância da correta escolha do regime terapêutico neste grupo etário (KHWAJA et al., 2016).

2.1.2 Leucemia Mieloide Crônica

A LMC é uma doença onco-hematológica progressiva, responsável por até 20% de todos os casos de leucemia recém diagnosticados em adultos (SOVERINI et al, 2015). É caracterizada pela proliferação excessiva das células da linhagem mieloide na medula óssea, em especial os granulócitos (KHAJAPÉER, BASKARAN, 2015) e pelo acúmulo destas células no sangue (RENZI et al. 2015).

Com base nos dados clínicos, a LMC inclui as fases crônica, acelerada e blástica (KHAJAPÉER, BASKARAN, 2015). Noventa e cinco por cento dos pacientes são diagnosticados na fase crônica, onde os achados clínicos incluem leucocitose, células leucêmicas bem diferenciadas, com desvio a esquerda, e proliferação relativamente lenta. Mesmo assim, se o tratamento não é iniciado a tempo e de forma adequada, a doença pode progredir para a fase acelerada, caracterizada pelo aumento do número de blastos imaturos no sangue periférico. Por conseguinte, a LMC passa para fase blástica, indicando que a doença evoluiu para a fase aguda. Nessa fase, há uma rápida expansão de blastos (EMOLE, TALABI, PINILLA-IBARZ, 2016), com contagem superior a 20% no sangue periférico e na medula óssea. Gânglios linfáticos, pele, ossos, superfícies serosas, gastrointestinais e do trato geniturinário são os locais mais comuns de crises blásticas extramedulares (JAIN, GUPTA, 2016).

Assim como na LMA, embora a doença possa ser encontrada em qualquer faixa etária, ocorre principalmente em pessoas de meia idade e sua incidência aumenta com o envelhecimento (EMOLE, TALABI, PINILLA-IBARZ, 2016).

Geneticamente, a LMC é caracterizada pela presença do cromossomo Philadelphia (Ph), resultado da translocação recíproca $t(9;22)(q34;q11)$ entre os cromossomos 9 e 22 (FIGURA 3) (EYÜPOĞLU et al., 2016; HOFFBRAND, MOSS, PETTIT, 2006), na qual parte do proto-oncogene c-ABL é transferido para o gene BCR no cromossomo 22 e parte do cromossomo 22 é transferido para o cromossomo 9 (HOFFBRAND, MOSS, PETTIT, 2006), levando a formação do oncogene BCR-ABL. A proteína produzida pela fusão destes genes é uma tirosina cinase (JABBOUR, 2016), que possui um papel central na patogênese da LMC (SOVERINI et al., 2015) e é responsável pelo fenótipo da leucemia através da ativação constitutiva de múltiplas vias de sinalização (EYÜPOĞLU et al., 2016). Esta fusão promove a proliferação de células progenitoras características da LMC e ativa a sinalização de proteínas que promovem a proliferação do crescimento independente de fatores de crescimento, adesão alterada, resistência a reparação do DNA e inibição da apoptose, o que culmina na transformação das células tronco hematopoiéticas. Dessa forma, a fusão da transcrição BCR-ABL1 e sua cinase resultante tornaram-se um alvo chave e biomarcador no tratamento e monitoramento da LMC (ZHEN, WANG, 2013).

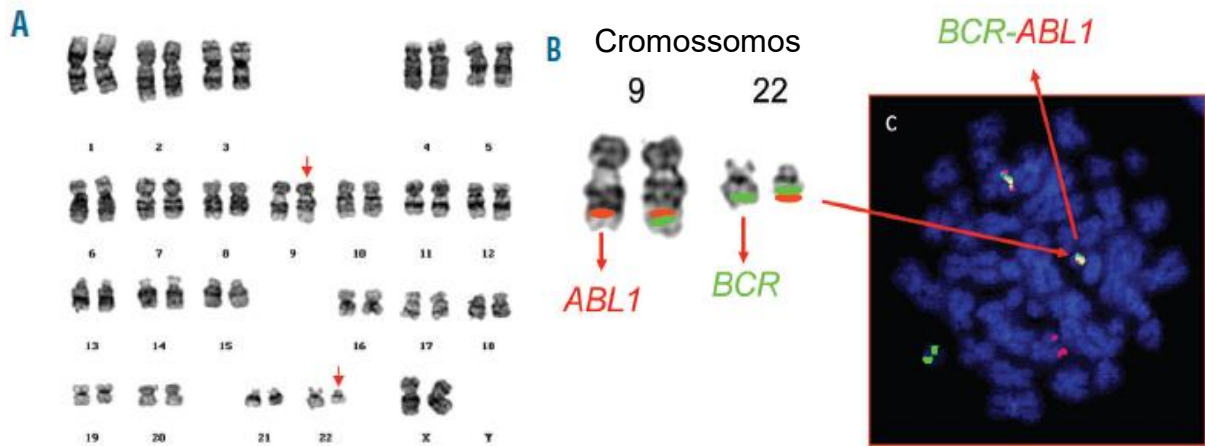


Figura 3: (A) cariótipo de um paciente com LMC, onde ocorre a translocação t (9; 22) (q34; q11) (cromossomos alterados são apontados pelas setas na figura C). (B) Cromossomos 9 e 22 com as sondas FISH correspondentes para BCR e ABL1, seguido da fusão dos cromossomos.

Fonte: adaptado de Mughal et al., 2016

A fusão em diferentes pontos de quebra no locus do gene BCR produz três diferentes oncoproteínas, denominadas p190, p210 e p230 (FIGURA 4). A p190 é um fator etiológico da LLA; a p210 é a principal proteína envolvida na LMC e a p230 está relacionada, de forma menos expressiva, à LMC (KHAJAPPEER, BASKARAN, 2015). A proteína BCR-ABL de 210 KDa possui uma atividade de tirosina cinase constitutiva, resultando no fenótipo maligno das células afetadas por ativação das vias celulares que levam a um aumento da proliferação e da resistência a apoptose, e a alteração das propriedades de adesão (EMOLE, TALABI, PINILLA-IBARZ, 2016).

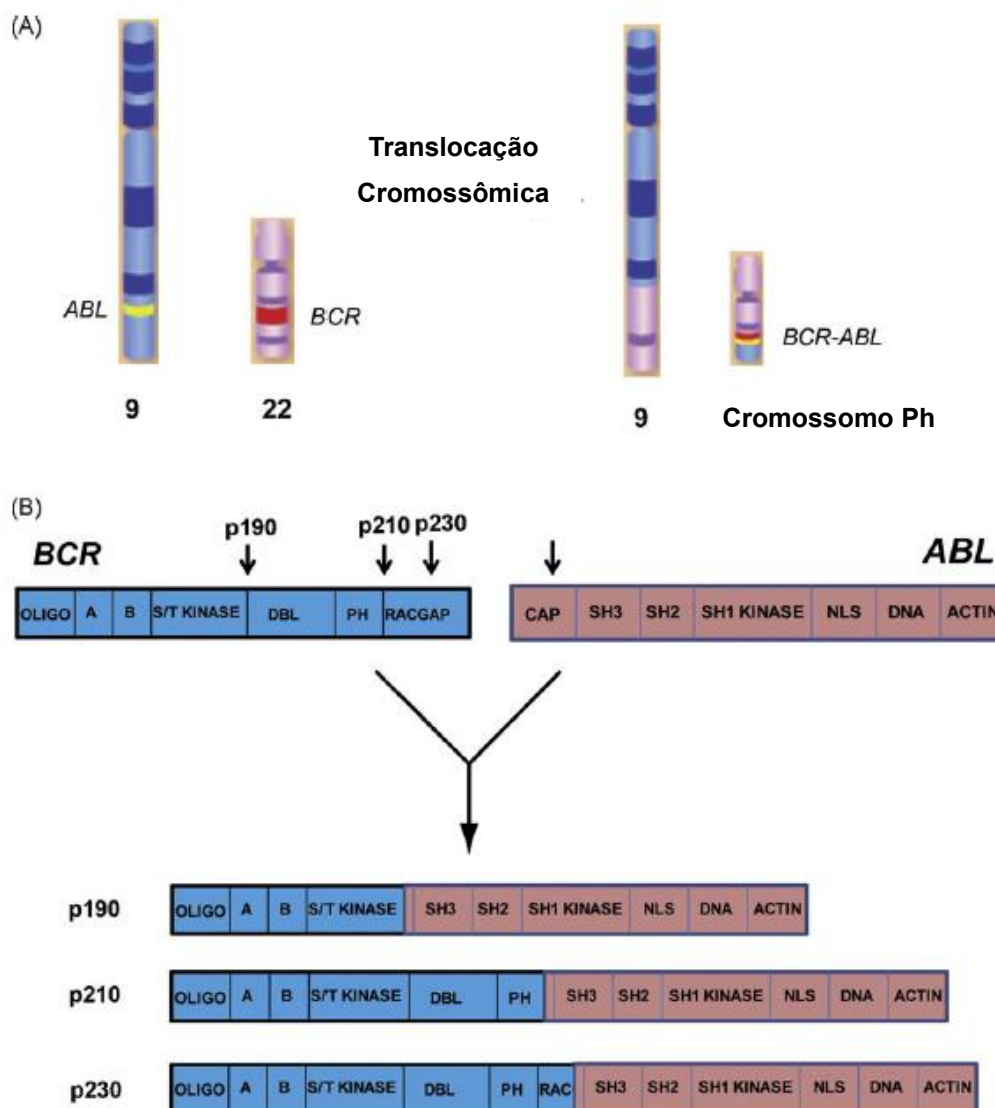


Figura 4: (A) O cromossomo Ph é formado como resultado de uma translocação recíproca entre os cromossomos 9 e 22. O gene BCR do cromossomo 22 é unido no gene ABL1 do cromossomo 9, resultando na formação do oncogene BCR-ABL1. (B) Distintos pontos de interrupção no gene BCR podem levar à formação de diferentes oncogenes BCR-ABL1, cada um com características leucêmicas únicas. O oncogene que codifica a isoforma p190 está associado com a LLA; o oncogene que codifica a isoforma p210 e p230 estão associados com a LMC, porém o p230 tem atividade cinase mais fraca. Fonte: Adaptado de Sullivan et al., 2010

Cerca de 90% dos pacientes portadores desta leucemia apresentam o cromossomo Ph (CHAKRABORTY et al., 2016). A pequena porcentagem de pacientes com características sugestivas de LMC, mas negativos para o cromossomo Ph e translocação BCR-ABL, quase sempre possuem aspectos hematológicos típicos da mielodisplasia, e prognóstico aparentemente pior que o da LMC Ph positivo

(HOFFBRAND, MOSS, PETTIT, 2006)

Os principais sintomas da fase crônica de LMC são inespecíficos e incluem fadiga, anorexia, desconforto abdominal, esplenomegalia e pequenos sangramentos. Algumas vezes, podem apresentar sinais de hipermetabolismo, como suores noturnos, perda de peso e febre. Na fase blástica, os sintomas incluem citopenia, infecções e hemorragia até a falência dos órgãos (EMOLE, TALABI, PINILLA-IBARZ, 2016).

Antigamente, a única terapia curativa para LMC era o transplante de células tronco hematopoiéticas, porém além dos altos custos, apresentava altas taxas de morbidade e era limitado apenas aos pacientes com um doador adequado (LIN et al, 2016). Atualmente, o principal tratamento é baseado no uso de inibidores da tirosina cinase (TKI), como o imatinib, administrados uma ou duas vezes ao dia e geralmente bem tolerados pelos pacientes. Fármacos que possuem a tirosina cinase como alvo podem conseguir remissões citogenéticas e moleculares duráveis, melhorar a sobrevida da maioria dos pacientes e, demonstrar uma expectativa razoável de cura da doença, uma vez que uma alta porcentagem de pacientes atinge uma boa resposta molecular (SAUBELE et al., 2016). Em 2010, foi aprovado o uso da segunda geração dos TKI: dasatinib (100 mg/ dia) e nilotinib (300 mg duas vezes/ dia) como terapias de primeira linha para pacientes com LMC em fase crônica. Outra opção de tratamento para estes pacientes é o transplante de células-tronco hematopoiéticas, introduzido na década de 70 (TALPAZ, 2012).

Os pacientes de LMC em tratamento são monitorizados constantemente através de exames da medula óssea, análise citogenética, hibridização fluorescente *in situ* (FISH), e qPCR para verificar a evolução do tratamento da doença (ZHEN, WANG, 2013).

2.2 Linfomas

Linfomas são um grupo heterogêneo de doenças malignas linfoproliferativas com diferentes padrões de comportamento e respostas ao tratamento (SQUILLACI et al., 2016). Geralmente se acumulam nos linfonodos e ocasionalmente podem invadir o sangue ou infiltrar órgãos fora do tecido linfoide (HOFFBRAND, MOSS, PETTIT,

2006). Se manifestam caracteristicamente com adenomegalia superficial ou de cadeias ganglionares profundas, e pode haver hepato e esplenomegalia em muitos casos, além de crescimentos tumorais em outros órgãos e tecidos, como ossos, pele, glândulas, sistema nervoso central e aparelho digestivo (LORENZI et al., 2003).

Sua divisão é feita em duas categorias: linfoma de Hodgkin (LH) e LNH, este último, abordado neste trabalho. O LH é mais comum em adultos jovens com idade entre 15 e 40 anos e surge quando células imunes, mais frequentemente os linfócitos B, se transformam em células malignas com capacidade de crescer descontroladamente afetando os gânglios linfáticos e, algumas vezes, outros órgãos através dos vasos linfáticos (VILLASBOAS, ANSELL, 2016; INCA, 2016). O LNH compreende vários subtipos, com diferentes locais de origem, comportamento clínico e resposta ao tratamento. Ele é mais comum em adultos e é derivado das células B e T originadas na medula óssea (INCA, 2016; SOCIEDADE BRASILEIRA DE ONCOLOGIA, 2016).

2.2.1 Linfoma Não-Hodgkin

Os LNH são neoplasias malignas linfoides com comportamento biológico e clínico diversificado (ANSELL, 2015). De acordo com a OMS, existem mais de 40 subtipos de LNH, classificados com base nas características históricas e patológicas da doença. Seu surgimento ocorre a partir dos gânglios linfáticos (SOLIMINI et al., 2016) ou por proliferações clonais de linfócitos T, B ou das células *Natural Killer* (NK), que se infiltram nos tecidos linfoides e hematopoiéticos, podendo se estender a outros órgãos (LORENZI et al., 2003; HOFFBRAND, MOSS, PETTIT, 2006; ANSELL, 2015; CHABNER, LYNCH, LONGO, 2008).

Imunossupressão, infecções, diabetes mellitus tipo 2, transfusões sanguíneas, tabagismo, álcool, exposição à radiação ultravioleta e o tipo de dieta estão entre os principais fatores de risco para o desenvolvimento de LNH (SOLIMINI et al., 2016). Além disso, várias etiologias genéticas e infecciosas têm sido associadas com os diferentes subtipos do LNH. Entre elas, encontra-se o vírus Epstein-Barr, normalmente associado a linfomas de células B (por exemplo, o linfoma de Burkitt), o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (ANSELL, 2015), e o vírus da hepatite C (ZHAO,

2015).

Assim como nos outros tipos de doenças onco-hematológicas abordadas neste trabalho, o LNH é mais comum em adultos e aumenta com a idade, possuindo maior prevalência em pessoas do sexo masculino (WELEDJI, OROCK, 2015). Normalmente, os pacientes apresentam linfadenopatia indolor persistente (ANSELL, 2015), com aumento assimétrico dos linfonodos em uma ou mais regiões, anemia, infecções decorrentes da neutropenia ou da diminuição da imunidade celular, trombocitopenia com púrpura em pacientes com acometimento difuso da medula óssea, hepatoesplenomegalia, sintomas abdominais agudos (HOFFBRAND, MOSS, PETTIT, 2006), e sintomas da tríade B, que incluem febre, perda de peso e sudorese noturna (WELEDJI, OROCK, 2015).

O correto diagnóstico é de suma importância para o tratamento adequado da doença. Ele é realizado através da anamnese, exame físico, hemograma, investigação sorológica, radiografia do tórax, tomografia computadorizada das áreas afetadas e biópsia do tecido lesionado (WELEDJI, OROCK, 2015), conforme a classificação da OMS de neoplasias linfoides, a qual separa as neoplasias em quatro principais categorias: precursor das células B e neoplasias das células T, neoplasias das células B maduras, neoplasias das células NK e T maduras e desordens linfoproliferativas associadas a imunodeficiência (ANSELL, 2015). Como o baço é o maior órgão do sistema linfático, o padrão ouro para o diagnóstico de LNH é a avaliação histológica desse órgão. Após a primeira leva de exames é feita a detecção do estadiamento da doença através do sistema Ann Arbor, que inclui os exames de imagem: tomografia computadorizada, ressonância magnética e tomografia computadorizada por emissão de pósitrons (PET-TC) (WELEDJI, OROCK, 2015).

Anteriormente, as opções de tratamento para pacientes portadores de linfoma eram baseadas em quimioterapia citotóxica e radioterapia (GROVER, PARK, 2015), mas apesar da boa resposta ao tratamento, as taxas de recaída eram muito elevadas, o que levou a necessidade de terapias adicionais, como o transplante de células tronco (ANSELL, 2015) e a introdução de novas abordagens de imunoterapia (GROVER, PARK, 2015). Dentre os novos agentes alvos, encontra-se o uso do anticorpo monoclonal quimérico de CD20, rituximab, que provoca a morte das células B. Ele pode ser usado como agente único, em conjunto com quimioterápicos do

esquema CHOP (ciclofosfamida, hidroxildaunorrubicina, vincristina e prednisona) e na terapia de manutenção de LNH de células B (GROVER, PARK, 2015; SEYFIZADEH et al., 2015; FLEURY, 2016).

2.3 Eventos epigenéticos como marcadores em doenças onco-hematológicas

Estudos pré-clínicos já demonstraram que o processo de leucemogênese, bem como de qualquer outra doença onco-hematológica, necessita de diversos eventos mutagênicos para levar à formação maligna. Duas classes de mutações foram descritas: as mutações do tipo I estão envolvidas com vias de transdução de sinal e proliferação celular, enquanto que mutações do tipo II afetam fatores de transcrição e mecanismos de diferenciação celular (BACHER et al., 2010; MARCUCCI et al., 2011). Uma terceira classe de mutações, que envolvem modificadores epigenéticos, já foi proposta (BEJAR et al., 2011; XU et al., 2014; HAFERLACH et al., 2014; LIN et al., 2014). Eventos epigenéticos envolvem mecanismos de ativação ou silenciamento de genes por modificações na conformação da cromatina ou do DNA, sem alterar a sequência de nucleotídeos. Atualmente, tem-se investigado quais eventos seriam os primeiros a ocorrer na evolução tumoral, já que várias etapas são necessárias até a formação de uma célula maligna; alterações epigenéticas estão presentes em praticamente todos os tumores conhecidos. Alguns estudos sugerem que, para determinados tipos de tumor, o mecanismo deflagrador seria um evento epigenético, que causaria uma instabilidade do genoma, facilitando a ocorrência de outras mutações necessárias na formação de uma neoplasia (ZOGHBI, BEAUDET, 2016).

A epigenética envolve três principais alterações de controle transcricional: a metilação do DNA, RNAs não codificadores e a desacetilação das proteínas histonas do DNA. Essas modificações epigenéticas, que são mais frequentes em pacientes com mais idade (OWEN ET AL., 2010; PALLIS ET AL., 2014), são mediadas na mielodisplasia e na LMA por genes tais como *Metilcitosina Desoxigenase 2 (TET2)* e *Potenciador do Homólogo Zeste 2 (EZH2)*, e correlacionam positivamente com pior resposta ao tratamento e menor sobrevida, mas os mecanismos pelos quais esses genes contribuem ao fenótipo leucêmico ainda não foram identificados (SHEN et al., 2011). O *TET2* codifica uma das enzimas que permite a metilação da citosina e o *EZH2* está relacionado com o remodelamento da cromatina. Mutações no *TET2* são

uma das mutações mais frequentes na SMD. A perda da sua função através da mutação é fortemente associada à hipermetilação do DNA, o que já foi observado em blastos na LMA. Mutações neste gene também estão associadas com o desenvolvimento de monocitose, leucocitose e idade avançada no diagnóstico (JANKOWSKA et al., 2009; SMITH et al., 2010; TEFFERI et al., 2009a; TEFFERI et al., 2009b).

Mutações com perda de função no *EZH2* foram identificadas em LMA (CAYE et al., 2015; ERNST et al., 2010; NIKOLOSKI et al., 2010). Já mutações com ganho de função, são frequentemente presentes em linfoma de células B, sugerindo um papel pró-oncogênico em malignidades linfoides (SNEERINGER et al., 2010; MORIN et al., 2010; YAP et al., 2011). Ainda, estudos revelaram que a baixa expressão de *EZH2* e da Lisina Desmetilase 2B (*KDM2B*) foi significativamente relacionada com doença agressiva (GENTLES et al., 2015; CANCER, 2013; CABRERO et al., 2016).

Recentemente, Andricovich e colaboradores relataram que *KDM2B*, uma histona desmetilase, age de forma oncogênica na linhagem linfóide, ao mesmo tempo suprimindo a linhagem mieloide, ressaltando a complexidade dos eventos que precedem a transformação de células hematológicas (ANDRICOVICH et al., 2016). De acordo com He et al, a *KDM2B* é um fator epigenético crítico envolvido na leucemogênese e renovação de células-tronco. Em resposta a sinais oncogênicos, sua expressão é elevada durante a leucemogênese (HE et al., 2011b).

Adicionando ainda mais complexidade à gênese de doenças hematológicas, Stein recentemente descreveu o papel da Isocitrato Desidrogenase 2 (*IDH2*) (STEIN, 2015). Localizado no cromossomo 15q26.1, possui atividade mitocondrial e está relacionado com modificações epigenéticas. Mutações do *IDH* também foram identificadas em LMA (GREEN, BEER, 2010; MARDIS et al., 2009). Pacientes com LMA muitas vezes apresentam mutações em reguladores epigenéticos como *IDH2* (IM et al., 2014). Mutações em *IDH2* e *TET2* levam a padrões de diferenciação mieloide diminuídos e alta expressão de marcadores de células tronco (FIGUEROA et al., 2010). Assim, a expressão do *IDH2* mutado pode conduzir a um efeito epigenético dependente de *TET2* (MASCARENHAS et al., 2011).

3. PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

3.1 Tipo de Pesquisa

O presente estudo é classificado como quantitativo, experimental, utilizando modelos de cultura celular *in vitro*, divididos em grupos experimentais e grupos controle (células não tratadas).

3.2 Local de pesquisa

O projeto foi implementado e conduzido nos laboratórios de Biotecnologia, Biologia Molecular e Cultura de Células do Centro Universitário UNIVATES.

3.3 Linhagens celulares

As linhagens celulares de doenças onco-hematológicas foram obtidas através de doação do Laboratório de Medula Óssea e Células Tronco, localizado no Departamento de Bioquímica da Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo UNIFESP (Tabela 1), e foram cultivadas em meio apropriado (Tabela 2). As células foram mantidas a 37 °C em estufa umidificada, a 5% de CO₂ atmosférico.

Tabela 1 - Descrição das linhagens utilizadas no estudo

Linhagem	Origem	Espécie
KASUMI-1	Leucemia Mieloide Aguda	Humana

K-562	Leucemia Mieloide Crônica	Humana
RAJI	Linfoma não Hodgkin	Humana

3.4 Protocolo de cultivo das células

Todos os procedimentos de cultivo foram realizados em capela de fluxo laminar, seguindo os protocolos para manutenção de esterilidade dos materiais, suplementos e meio de cultura utilizados.

3.4.1 Crescimento e mantimento da cultura celular

As células foram cultivadas em frascos de 25 cm² contendo 7mL de RPMI-1640, suplementados com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB, Nutricell) e 1% de solução antibiótica antimicótica (Sigma) e mantidas a 37 °C em estufa umidificada, a 5% de CO₂ atmosférico. Houve um período observacional, onde o crescimento celular e as alterações morfológicas foram monitorados em microscópio. O meio de cultura foi trocado conforme a necessidade de cada linhagem.

Tabela 2 - Meios utilizados na manutenção das diferentes linhagens

Linhagem	Meio	Suplementação com SFB
KASUMI-1	RPMI-1640	10%
K-562	RPMI-1640	10%
RAJI	RPMI-1640	10%

3.4.2 Congelamento e descongelamento das células

As culturas celulares foram expandidas para o congelamento em fase Log com 1×10^6 células/mL/criotubo. As células foram centrifugadas a 610 g por 5 min, o sobrenadante foi descartado, e o pellet de células homogeneizado em solução contendo 95% SFB e 5% dimetil sulfoxido (DMSO). Alíquotas de 1 mL foram dispensadas em criotubos. Os criotubos foram colocados a -20 °C por 30 minutos, depois a -80 °C por duas horas, e finalmente armazenados a -185 °C. O descongelamento deu-se a 37 °C, em no máximo 5 minutos, onde o conteúdo do

criotubo foi dispensado em frascos já contendo 4 mL do meio de cultura celular apropriado. Uma pequena alíquota do descongelado foi retirada para um ensaio de exclusão por tripan, a fim de observar se houve morte celular durante o processo de congelamento/descongelamento. Após 24 horas, trocou-se o meio de cultura, e as células se encontram aptas para sub-cultivo.

3.5 Origem, preparo e dose dos fármacos e compostos estudados

3.5.1 Fármacos utilizados neste estudo

Os fármacos bem como sua ação e respectivas doses utilizadas neste estudo são descritos na Tabela 3.

Tabela 3- Fármacos utilizados

Reagente	Ação	Dose	Marca
Citarabina (Ara-C)	Inibe a DNA Polimerase	10 μ M e 25 μ M	Libbs
Decitabina (Deci)	Inibe a DNA metiltransferase	1 μ M, 10 μ M e 25 μ M: tratamentos isolados 100 nM: associações	Cayman
Doxorrubicina (Doxo)	Antraciclina; se intercala ao DNA e inibe topoisomerase II	1 μ M e 25 μ M	Sigma
Etoposídeo (VP-16)	Inibe a topoisomerase II	1 μ M e 25 μ M	Blau
Metotrexato (MTX)	Interfere na síntese de DNA, replicação e restauração celular	10 μ M, 50 μ M e 100 μ M	Libbs
Vincristina (VCR)	Inibe o movimento de microtúbulos na divisão celular	1 μ M e 2,5 μ M	Zodiac

3.5.2 Estabelecimento de curvas de dose dos fármacos

As células foram plaqueadas em pelo menos três replicatas técnicas, em placas

de 4 e 24 poços a uma densidade de 3×10^4 , e tratadas em seguida. As soluções foram preparadas de forma que os volumes da solução de fármaco não excedessem 10% do volume máximo de cada poço, a fim de não diluir o meio de cultivo.

Para todos fármacos foi realizada uma busca de doses na literatura, e as células foram tratadas utilizando não só a dose indicada, mas também em diluição 100 vezes menores, 10 vezes menores, 10 vezes maiores e 100 vezes maiores do que a estabelecida na literatura. O efeito de cada dose foi avaliado pelo método de exclusão de azul de tripan.

3.6 Avaliação do crescimento, da viabilidade e da sobrevivência celular

3.6.1 Crescimento e citotoxicidade celular – contagem

As células previamente plaqueadas e tratadas em placas de 4 e 24 poços foram contadas 24 e 48 horas após o tratamento utilizando o corante azul de tripan, a fim de diferenciar células viáveis de células mortas. Este corante é permeável apenas para as células cuja membrana celular está comprometida, e, por isto, as que coram azul são consideradas mortas. O meio de cultura contendo as células em suspensão foi removido de cada poço, transferido para um microtubo e centrifugado a 610 g por 5 minutos. Soro fisiológico a 0,9 % foi adicionado a cada tubo para que todos tivessem um volume final de 200 μ L. Vinte microlitros de cada tubo foi removido e misturado com o mesmo volume do corante azul de tripan. Dez microlitros desta mistura foi colocada em uma câmara de Neubauer, visualizada em um microscópio de luz indireta. As células viáveis foram contadas em cada campo, e depois as células mortas do mesmo campo foram contadas. Através desta contagem, quando comparada à contagem do controle, obtivemos um índice de crescimento e/ou citotoxicidade celular.

3.7 Avaliação epigenética e de expressão gênica

A expressão gênica dos genes *IDH2*, *TET2*, *EZH*, e *KDM2B* foi avaliada, com fundamento nos relatos de Andricovich et al., 2016, Oakes et al., 2016 e Stein, 2016. Os *primers* utilizados estão descritos na tabela 4.

Tabela 4 - *Primers* utilizados na qPCR para identificação dos genes *IDH2*, *TET2*, *EZH2*, e *KDM2B* e os genes *actina* e *GAPDH* para controle de expressão

Gene	<i>Primers</i> Sequencia 5' – 3'	TM (°C)	Tamanho (pb)
<i>IDH2</i>	forward: ATGCCATCCAGAAGAAATGG	59.89 °C	175
	reverse: TGAGCCACCATGTCATCAAT	59.93 °C	
<i>TET2</i>	forward: TTGCAATGAGATACCCACACA	59.92 °C	200
	reverse: TGCAAACCAACAAAGATGGA	60.09 °C	
<i>EZH2</i>	forward: GGTGCTGAAGCCTCAATGTT	60.26 °C	197
	reverse: CACAACCGGTGTTTCCTCTT	60.01 °C	
<i>KDM2B</i>	forward: ACAACAAGGAAGGGCAGGAA	59.44 °C	196
	reverse: CCAGGTTTGAGCCGCTTG	59.04 °C	
<i>Actina</i>	forward: AAAGTGGACGGTGAAGGTG	60.01 °C	171
	reverse: AGAGAAGTGGGGTGGCTTTT	60.11 °C	
<i>GAPDH</i>	forward: CTTTGTCAAGCTCATTTCCTGG	54.20 °C	133
	reverse: TCTTCCTCTTGTGCTCTTGC	54.90 °C	

3.7.1 Extração do RNA total

As células foram colhidas após 48 horas do tratamento, procedendo-se à extração de RNA para as análises de expressão gênicas. Para as extrações de RNA total foi utilizado o reagente Trizol™ (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Após duas lavagens, o RNA foi eluído em água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC).

3.7.2 Quantificação do RNA

Para a quantificação, foram utilizados 2 µL da solução de RNA. As amostras foram lidas em duplicata em espectrofotômetro L-QUANT (Loccus Biotecnologia), nos

comprimentos de onda de 260 e 280 nm.

3.7.3 Síntese de cDNA

A síntese de DNA complementar foi efetuada com o kit SuperScript™ First-Strand Synthesis System for qPCR (Thermo Fisher). Foi feito um pool das amostras com mesmo tratamento (replicatas técnicas). À 100 ng de RNA foi adicionado 1 µL 10 mM *dNTP*'s, 50 µM oligo(dT)20 e água-DEPC para uma reação final de 10 µL. Após uma incubação de 5 minutos a 65°C, foi adicionado 9 µL de tampão contendo 25 mM MgCl₂, 0,1 M DTT, 1 µL RNaseOUT™ e 1 µL SuperScript II RT™. A amostra foi incubada a 42°C por 50 minutos, seguido de 70°C por 15 minutos para a síntese, que terminou com a adição de 1 µL RNaseH™ com uma incubação a 37°C por 20 minutos. Ao final da síntese foram obtidos 20 µL de cDNA, o qual foi armazenado à – 20°C.

3.7.4 PCR em tempo real

A amplificação do cDNA foi realizada em 45 ciclos através do sistema de qPCR no termociclador da StepOnePlus (Applied Biosystems, Foster City, CA), utilizando-se *primers* específicos para os genes previamente descritos na seção 3.7. A tabela 5 e 6 demonstram as quantidades de reagentes padronizadas para cada gene e cada linhagem, visando alcançar a melhor eficiência de cada reação.

Tabela 5 - Quantidade de reagentes padronizada e utilizada para cada reação de qPCR dos genes de interesse para linhagem RAJI e K-562

Reagente	Gene			
	<i>IDH2</i> (60°C)	<i>EZH2</i> (60°C)	<i>TET2</i> (59°C)	<i>KDM2B</i> (60°C)
Água ultra-pura	3,85 µL	3,85 µL	3,85 µL	3,5 µL
Buffer 10x	2 µL	2 µL	2 µL	2 µL
MgCl ₂ 50 mM	1,2 µL	1,2 µL	1,2 µL	1,5 µL
dNTP's 10 mM	-	-	-	0,1 µL
dNTP's 5 mM	0,1 µL	0,1 µL	0,1 µL	-
<i>Primer forward</i> 10 mM	0,4 µL	0,4 µL	0,4 µL	0,4 µL
<i>Primer reverse</i> 10 mM	0,4 µL	0,4 µL	0,4 µL	0,4 µL

SYBR Green (diluído 100 x)	2 µL	2 µL	2 µL	2 µL
Taq Platinum	0,05 µL	0,05 µL	0,05 µL	0,1 µL
cDNA (diluído 1:15)	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL
TOTAL	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL

Tabela 6 - Quantidade de reagentes padronizada e utilizada para cada reação de qPCR dos genes de interesse para linhagem KASUMI-1

Reagente	Gene	
	<i>IDH2</i> (60°C)	<i>KDM2B</i> (60°C)
Água ultra-pura	3,6 µL	3,5 µL
Buffer 10x	2 µL	2 µL
MgCl ₂ 50 mM	1,2 µL	1,5 µL
dNTP's 10 mM	0,1 µL	0,1 µL
<i>Primer foward</i> 10 mM	0,5 µL	0,4 µL
<i>Primer reverse</i> 10 mM	0,5 µL	0,4 µL
SYBR Green (diluído 100 x)	2 µL	2 µL
Taq Platinum	0,1 µL	0,1 µL
cDNA (diluído 1:15)	-	10 µL
cDNA (diluído 1:45)	10 µL	-
TOTAL	20 µL	20 µL

A Figura 5 resume as principais metodologias empregadas neste trabalho.

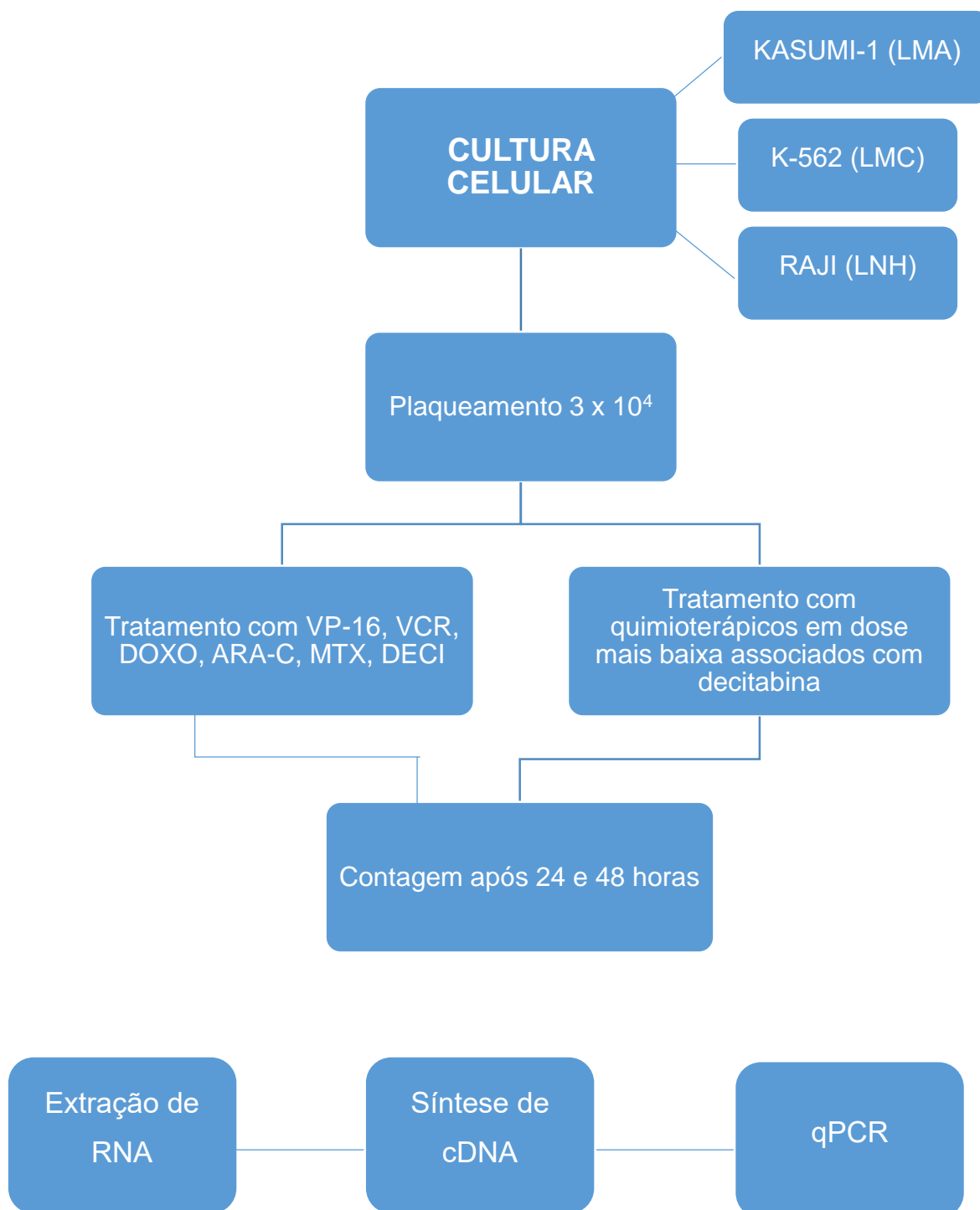


Figura 5: Descrição resumida da metodologia empregada no estudo

Fonte: Do Autor, 2016

3.8 Análise Estatística

Os dados foram tabulados e analisados com estatística descritiva empregando-se o software SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences, IBM Inc.*) versão 17.0

Aplicaram-se testes de normalidade para verificar a distribuição dos dados em paramétricos ou não paramétricos. Se paramétricos, os resultados foram expressos como média +/- desvio padrão da média (DP). Se não paramétricos foram expressos como mediana e seus intervalos interquartis (25 e 75%). As comparações então foram feitas por análise de variância (ANOVA) seguido do teste pós-hoc de Tukey para verificar se houve diferença entre grupos, quando paramétricos. Se não paramétricos, foi utilizado teste de Kruskal-Wallis, seguido de teste de correlações múltiplas de Dunn. O nível de significância adotado foi de 5%, sendo considerados significativos valores de $p \leq 0,05$.

3.9 Considerações Éticas

O projeto não envolveu uso de humanos ou animais, apenas linhagens celulares disponíveis comercialmente, não havendo, portanto, preocupações ou questionamentos referentes a aspectos éticos. Ainda assim, o projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Universitário UNIVATES por ser parte de um projeto guarda-chuva intitulado “Utilização de padrões epigenéticos e imunológicos como marcadores de toxicidade e de progressão no tratamento de doenças onco-hematológicas”, aprovado sob o parecer de número 1.619.803.

4. RESULTADOS

4.1 Avaliação da proliferação celular através do método de Azul de Tripan

Após padronização do crescimento celular e otimização da quantidade de células necessária por poço para o plaqueamento, foram feitas curvas de dose para cada quimioterápico. Foram realizadas curvas de dose para o agente desmetilante decitabina nas linhagens KASUMI-1, K-562 e RAJI, respectivamente. As comparações realizadas são referentes ao controle com as diferentes doses de quimioterápicos testadas (FIGURAS 6, 7 e 8).

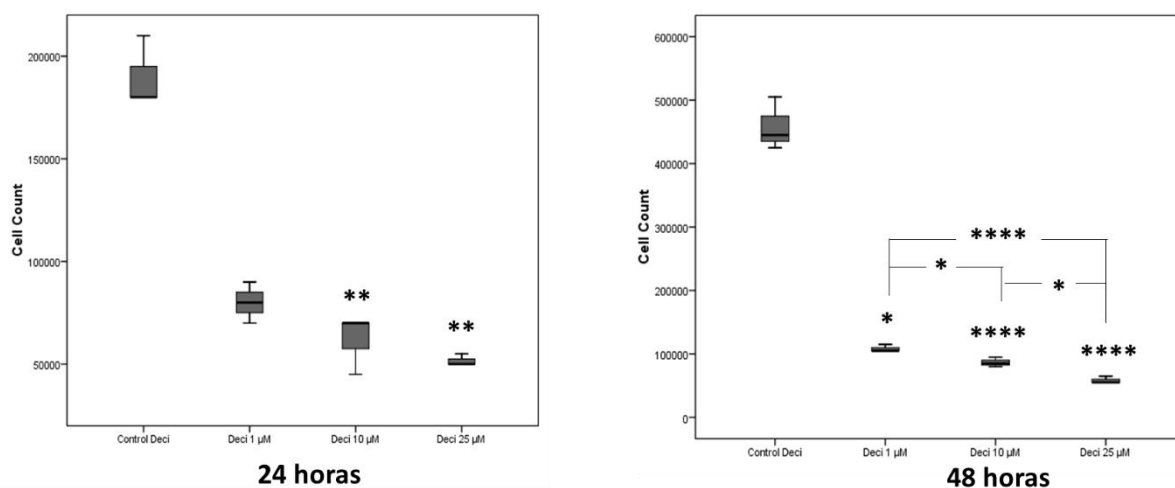


FIGURA 6: Curva de dose para o agente desmetilante decitabina na linhagem KASUMI-1. Comparação do controle com as diferentes doses utilizadas. Os valores de p foram determinados usando teste de Kruskal-Wallis, seguido de teste de correlações múltiplas de Dunn, utilizando $p < 0,05$ para determinar diferenças estatisticamente significativas. * $< 0,05$, ** $< 0,01$, **** $< 0,0001$

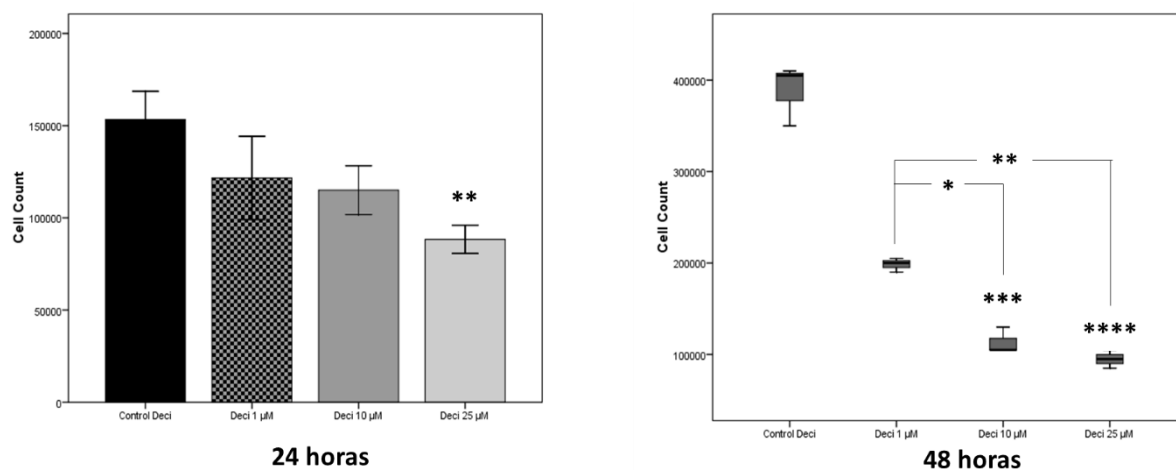


FIGURA 7: Curva de dose para o agente desmetilante decitabina na linhagem K-562. Comparação do controle com as diferentes doses utilizadas. Os valores de p foram determinados usando ANOVA de uma via, seguido de teste post hoc de Tukey (paramétricos), e teste de Kruskal-Wallis, seguido de teste de correlações múltiplas de Dunn (não paramétricos), utilizando $p < 0,05$ para determinar diferenças estatisticamente significativas. * $< 0,05$, ** $< 0,01$, *** $< 0,001$, **** $< 0,0001$

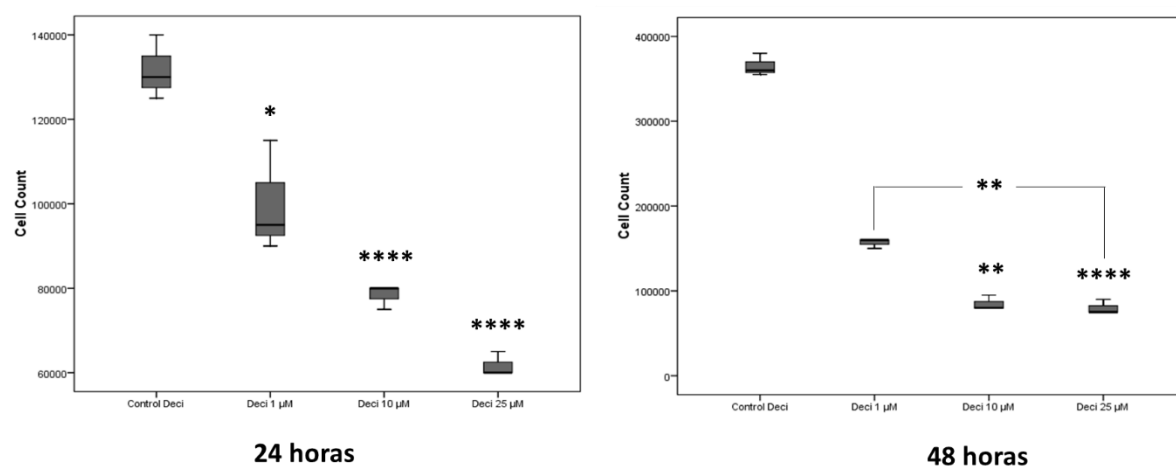


FIGURA 8: Curva de dose para o agente desmetilante decitabina na linhagem RAJI. Comparação do controle com as diferentes doses utilizadas. Os valores de p foram determinados usando teste de Kruskal-Wallis, seguido de teste de correlações múltiplas de Dunn, utilizando $p < 0,05$ para determinar diferenças estatisticamente significativas. * $< 0,05$, ** $< 0,01$, **** $< 0,0001$

4.1.1 Linhagem KASUMI-1 (Leucemia Mieloide Aguda)

O tratamento com doxorubicina, etoposídeo e citarabina, demonstrou diferença significativa no controle, nas duas doses de quimioterápicos e na associação

de quimioterápico de dose mais baixa com decitabina em relação ao tratamento isolado com decitabina a 100 nM após 24 horas de tratamento. Já com os quimioterápicos vincristina e metotrexato houve diferença significativa neste mesmo período de tempo apenas da decitabina em relação ao controle (FIGURA 9, 10, 11, 12 e 13).

No período de 48 horas pós tratamento, o controle e todos quimioterápicos testados apresentaram diferença significativa em relação a decitabina à 100 nM. Porém no tratamento com etoposídeo, também houve diferença significativa entre a dose de 1 μ M em relação a dose de 25 μ M e entre a dose de 25 μ M em relação a 1 μ M associado a decitabina (FIGURA 9, 10, 11, 12 e 13).

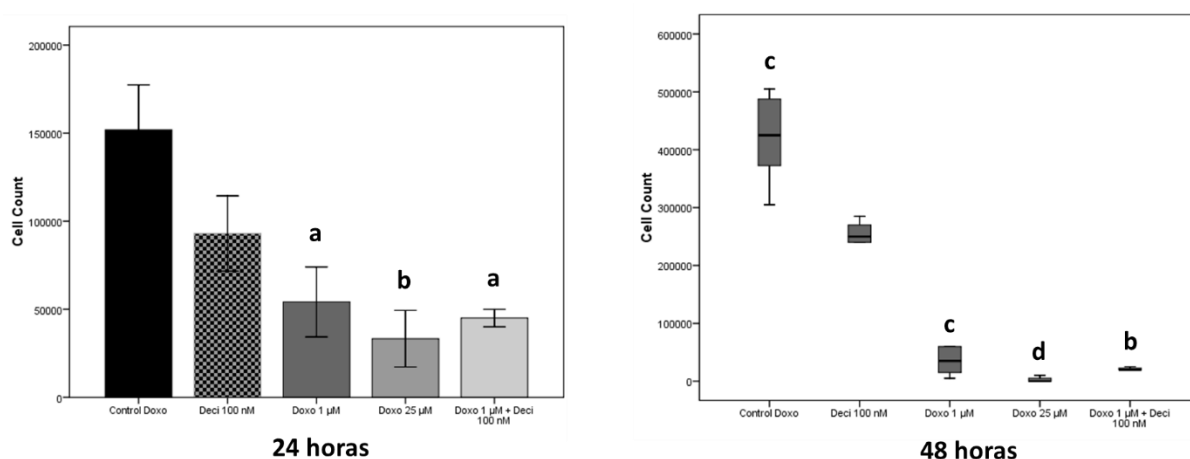


FIGURA 9: Contagem após 24 e 48 horas de tratamento com doxorubicina na linhagem KASUMI-1. As diferenças apresentadas são em relação ao agente desmetilante decitabina. Os valores de p foram determinados usando ANOVA de uma via, seguido de teste post hoc de Tukey (paramétricos), e teste de Kruskal-Wallis, seguido de teste de correlações múltiplas de Dunn (não paramétricos), utilizando $p < 0,05$ para determinar diferenças estatisticamente significativas. a $< 0,05$, b $< 0,01$, c $< 0,001$, d $< 0,0001$

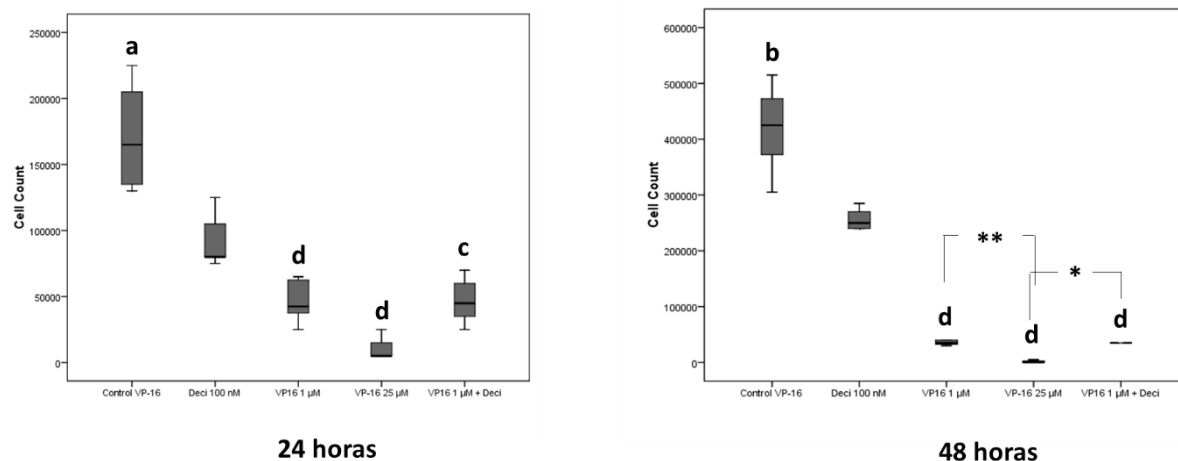


FIGURA 10: Contagem após 24 e 48 horas de tratamento com etoposídeo na linhagem KASUMI-1. Todas as amostras apresentaram diferença significativa em relação ao controle. As diferenças apresentadas são em relação ao agente desmetilante decitabina. Os valores de p foram determinados usando teste de Kruskal-Wallis, seguido de teste de correlações múltiplas de Dunn, utilizando $p < 0,05$ para determinar diferenças estatisticamente significativas. a/* $< 0,05$, b/** $< 0,01$, c $< 0,001$, d $< 0,0001$; valores de p representados em letras são em relação à decitabina; valores de p representados em * são em relação ao quimioterápico isolado

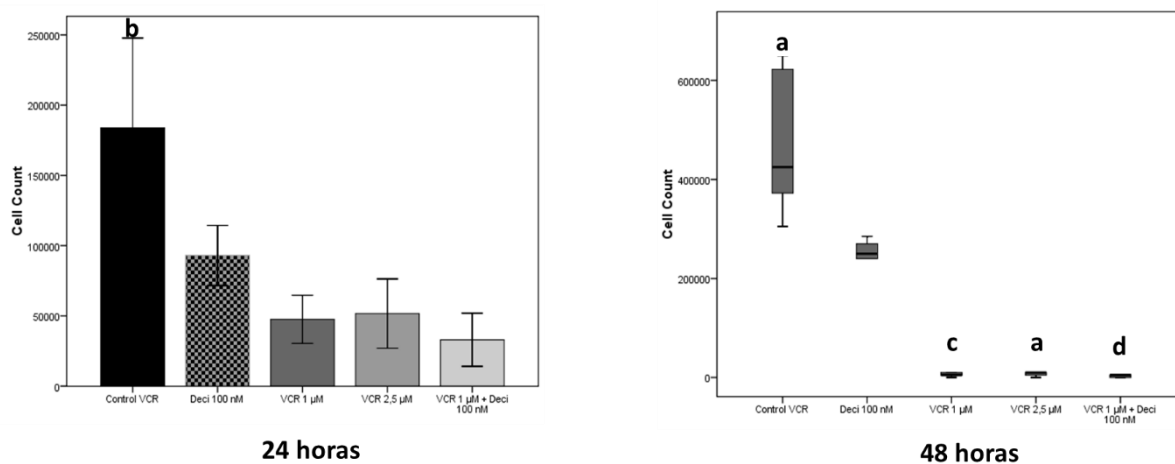


FIGURA 11: Contagem após 24 e 48 horas de tratamento com vincristina na linhagem KASUMI-1. Todas as amostras apresentaram diferença significativa em relação ao controle. As diferenças apresentadas são em relação ao agente desmetilante decitabina. Os valores de p foram determinados usando ANOVA de uma via, seguido de teste post hoc de Tukey (paramétricos), e teste de Kruskal-Wallis, seguido de teste de correlações múltiplas de Dunn (não paramétricos), utilizando $p < 0,05$ para determinar diferenças estatisticamente significativas. a $< 0,05$, b $< 0,01$, c $< 0,001$, d $< 0,0001$

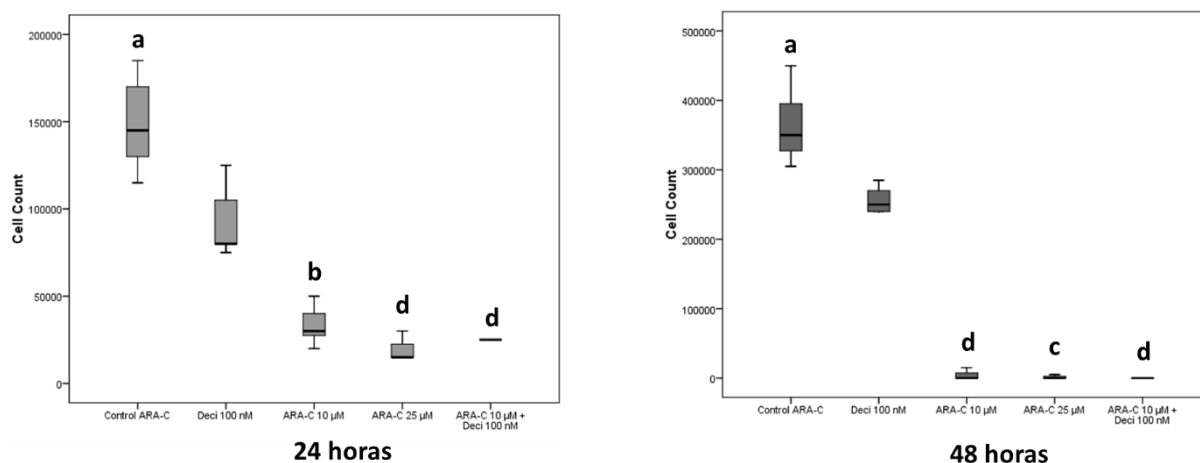


FIGURA 12: Contagem após 24 e 48 horas de tratamento com citarabina na linhagem KASUMI-1. Todas as amostras apresentaram diferença significativa em relação ao controle. As diferenças apresentadas são em relação ao agente desmetilante decitabina. Os valores de p foram determinados usando teste de correlações múltiplas de Dunn, utilizando $p < 0,05$ para determinar diferenças estatisticamente significativas. a $< 0,05$, b $< 0,01$, c $< 0,001$, d $< 0,0001$

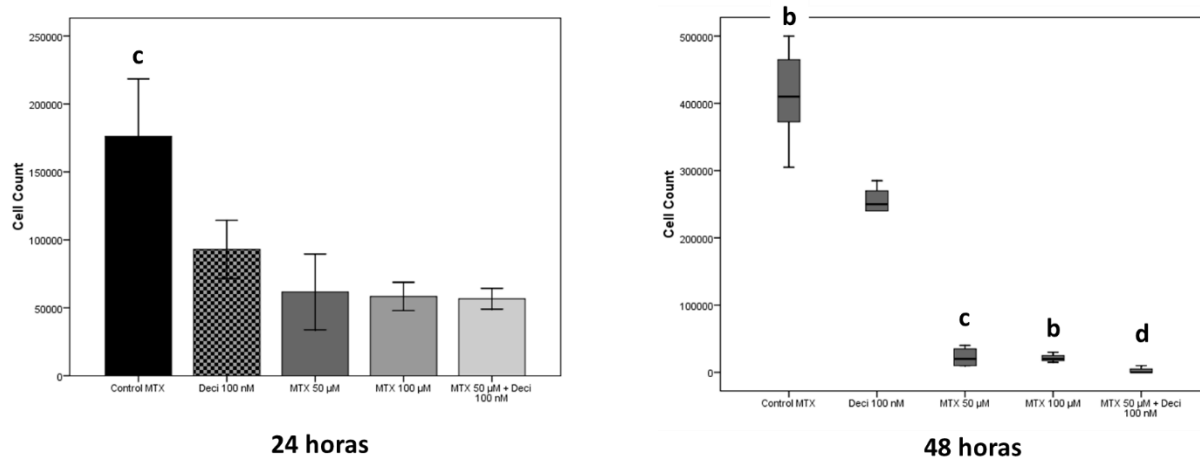


FIGURA 13: Contagem após 24 e 48 horas de tratamento com metotrexato na linhagem KASUMI-1. Todas as amostras apresentaram diferença significativa em relação ao controle. As diferenças apresentadas são em relação ao agente desmetilante decitabina. Os valores de p foram determinados usando ANOVA de uma via, seguido de teste post hoc de Tukey (paramétricos), e teste de Kruskal-Wallis, seguido de teste de correlações múltiplas de Dunn (não paramétricos), utilizando $p < 0,05$ para determinar diferenças estatisticamente significativas. b $< 0,01$, c $< 0,001$, d $< 0,0001$

4.1.2 Linhagem K-562 (Leucemia Mieloide Crônica)

O tratamento com doxorubicina, etoposídeo, citarabina, metotrexato e

vincristina, demonstrou diferença significativa nas duas doses de quimioterápicos testadas e na associação de quimioterápico com decitabina em relação a decitabina 100 nM após 24 horas de tratamento. Além disso, neste mesmo período de tempo, o tratamento de 1 μ M apresentou diferença significativa em relação ao quimioterápico de 1 μ M associado a decitabina (FIGURAS 14, 15, 16, 17 e 18).

No período de 48 horas após o tratamento com doxorrubicina, vincristina e metotrexato, o controle e todos quimioterápicos apresentaram diferença significativa em relação ao tratamento com o agente desmetilante decitabina. O tratamento com citarabina e etoposídeo apresentou diferença significativa apenas em relação aos tratamentos com quimioterápicos e sua associação com decitabina, mas não com o controle. Além disso, o tratamento com 1 μ M de doxorrubicina apresentou diferença em relação ao tratamento de dose de 25 μ M; e esta dose mais alta em relação ao quimioterápico associado a decitabina. Para os quimioterápicos etoposídeo e vincristina, além da diferença em relação a dose mais baixa de quimioterápico com a dose mais alta, houve diferença em relação a dose mais baixa se comparada a associação de quimioterápico com decitabina (FIGURAS 14, 15, 16, 17 e 18).

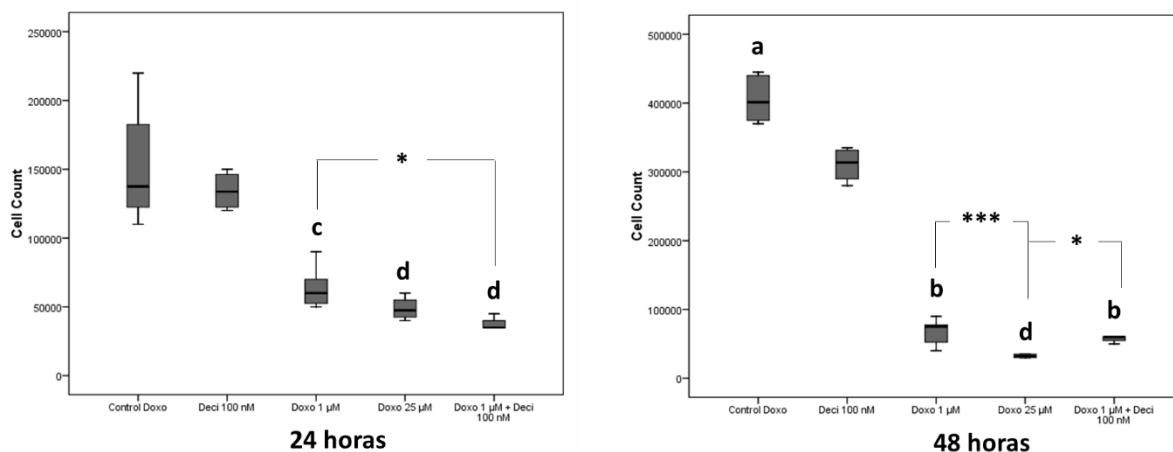


FIGURA 14: Contagem após 24 e 48 horas de tratamento com doxorrubicina na linhagem K-562. As diferenças apresentadas são em relação ao agente desmetilante decitabina. Os valores de p foram determinados usando teste de Kruskal-Wallis, seguido de teste de correlações múltiplas de Dunn, utilizando $p < 0,05$ para determinar diferenças estatisticamente significativas. */a $< 0,05$, b $< 0,01$, c/** $< 0,001$, d $< 0,0001$; valores de p representados em letras são em relação à decitabina; valores de p representados em * são em relação ao quimioterápico isolado

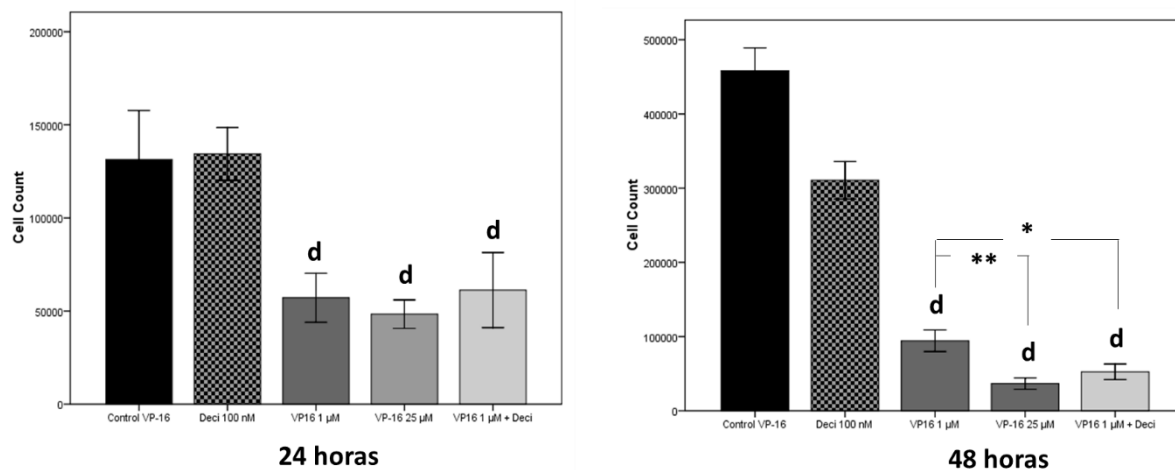


FIGURA 15: Contagem após 24 e 48 horas de tratamento com etoposídeo na linhagem K-562. As diferenças apresentadas são em relação ao agente desmetilante decitabina. Os valores de p foram determinados usando ANOVA de uma via, seguido de teste post hoc de Tukey utilizando $p < 0,05$ para determinar diferenças estatisticamente significativas. * $< 0,05$, ** $< 0,01$, d $< 0,0001$; valores de p representados em letras são em relação à decitabina; valores de p representados em * são em relação ao quimioterápico isolado

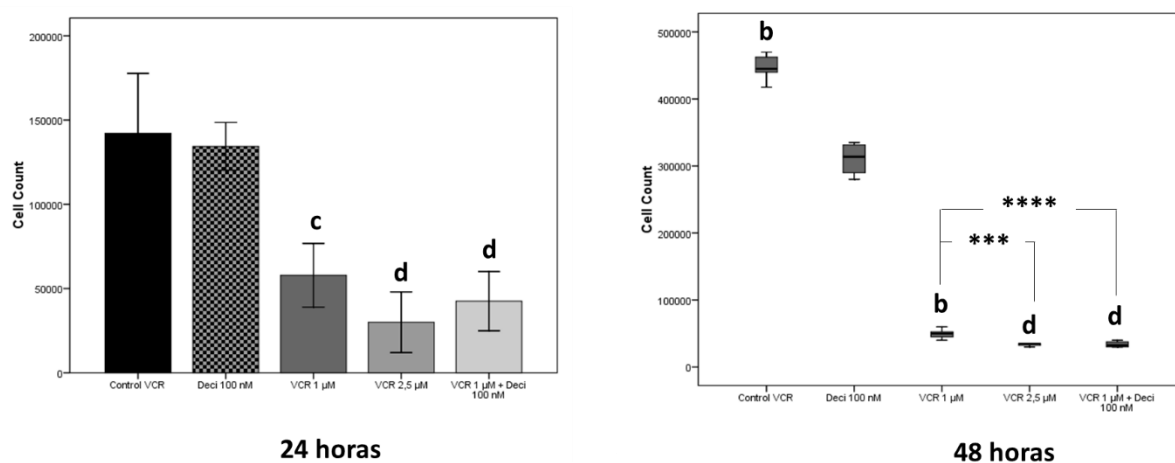


FIGURA 16: Contagem após 24 e 48 horas de tratamento com vincristina na linhagem K-562. As diferenças apresentadas são em relação ao agente desmetilante decitabina. Os valores de p foram determinados usando ANOVA de uma via, seguido de teste post hoc de Tukey (paramétricos), e teste de Kruskal-Wallis, seguido de teste de correlações múltiplas de Dunn (não paramétricos), utilizando $p < 0,05$ para determinar diferenças estatisticamente significativas. b $< 0,01$, c/** $< 0,001$, d/**** $< 0,0001$; valores de p representados em letras são em relação à decitabina; valores de p representados em * são em relação ao quimioterápico isolado

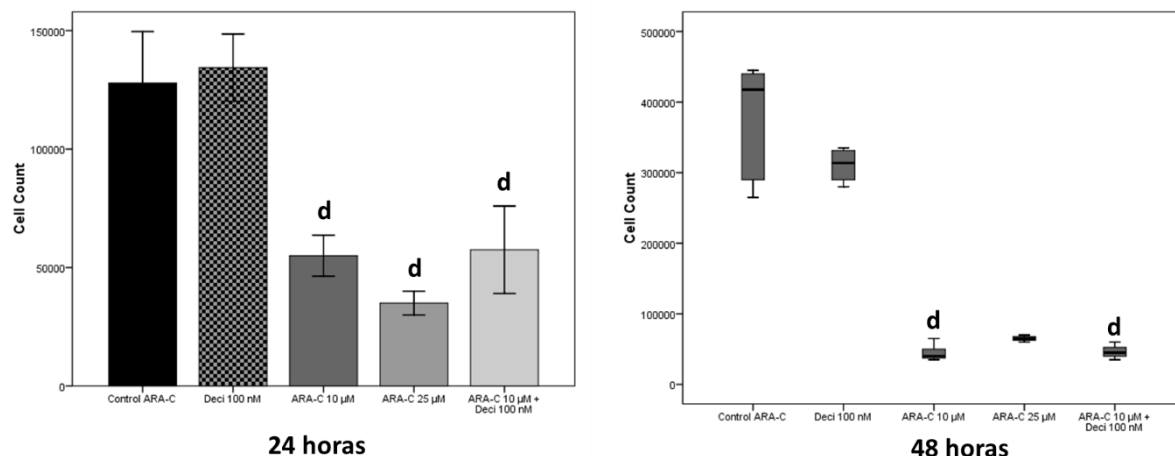


FIGURA 17: Contagem após 24 e 48 horas de tratamento com citarabina na linhagem K-562. As diferenças apresentadas são em relação ao agente desmetilante decitabina. Os valores de p foram determinados usando ANOVA de uma via, seguido de teste post hoc de Tukey (paramétricos), e teste de Kruskal-Wallis, seguido de teste de correlações múltiplas de Dunn (não paramétricos), utilizando $p < 0,05$ para determinar diferenças estatisticamente significativas. $d < 0,0001$

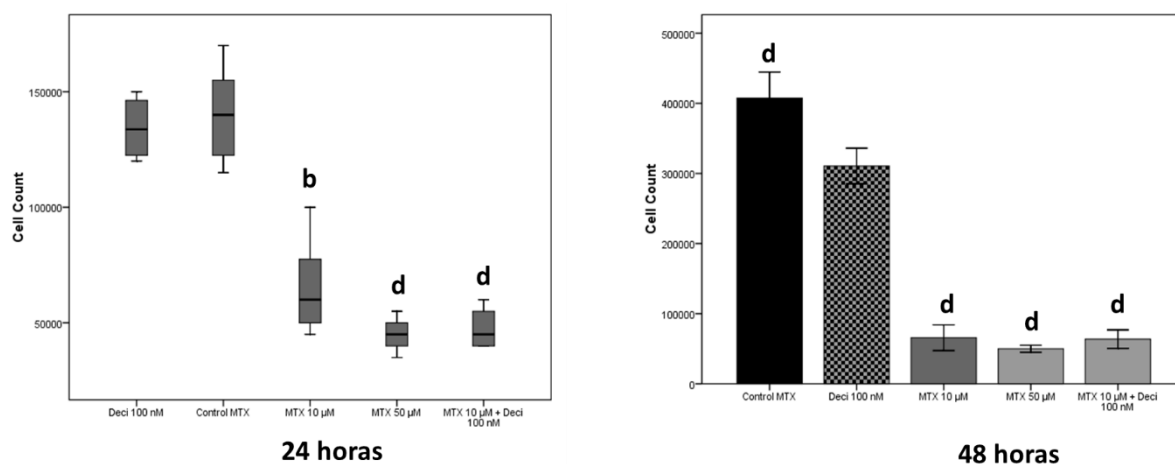


FIGURA 18: Contagem após 24 e 48 horas de tratamento com metotrexato na linhagem K-562. As diferenças apresentadas são em relação ao agente desmetilante decitabina. Os valores de p foram determinados usando ANOVA de uma via, seguido de teste post hoc de Tukey (paramétricos), e teste de Kruskal-Wallis, seguido de teste de correlações múltiplas de Dunn (não paramétricos), utilizando $p < 0,05$ para determinar diferenças estatisticamente significativas. $b < 0,01$, $d < 0,0001$

4.1.3 Linhagem RAJI (Linfoma não Hodgkin)

O tratamento com doxorrubicina, etoposídeo, vincristina e citarabina, demonstrou diferença significativa no controle, nas duas doses de quimioterápicos

testadas e na associação de quimioterápico com decitabina em relação a decitabina em dose de 100 nM após 24 horas de tratamento. Com o quimioterápico metotrexato, só houve diferença da decitabina para o controle. Além disso, neste mesmo período de tempo, o tratamento de etoposídeo à 1 μ M apresentou diferença significativa em relação a dose de 25 μ M; para o metotrexato houve diferença da dose mais baixa de quimioterápico em relação a dose mais alta e em relação a associação do quimioterápico com decitabina (FIGURAS 19, 20, 21, 22 e 23).

No período de 48 horas, todos quimioterápicos e o controle apresentaram diferença significativa em relação ao tratamento com decitabina a 100 nM. O tratamento com doxorrubicina apresentou diferença significativa em relação a dose de 1 μ M ao se comparar com a dose de 25 μ M; o tratamento com metotrexato demonstrou além desta última, diferença entre a dose de 1 μ M em relação a associação da dose mais baixa de quimioterápico com o agente desmetilante decitabina (FIGURAS 19, 20, 21, 22 e 23).

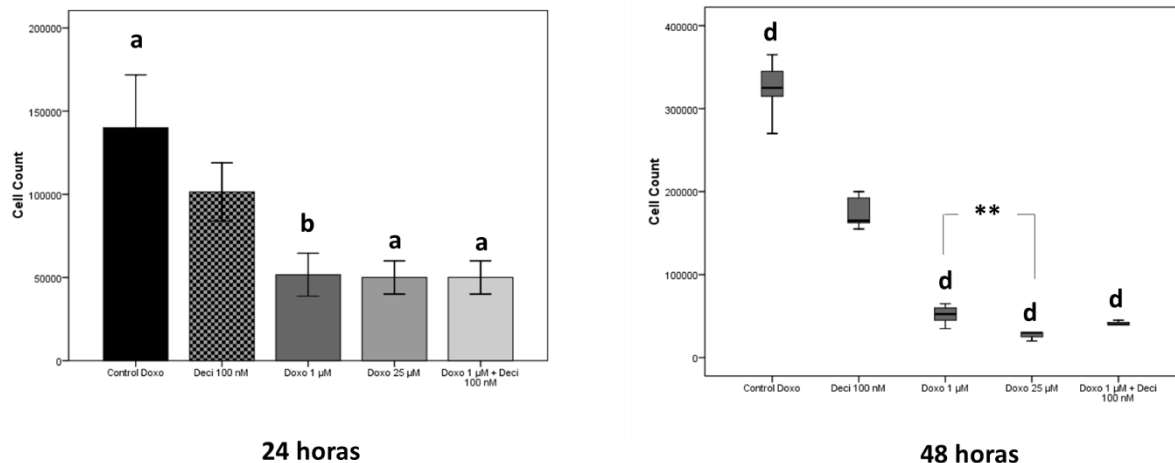


FIGURA 19: Contagem após 24 e 48 horas de tratamento com doxorrubicina na linhagem RAJI. Todas as amostras apresentaram diferença significativa em relação ao controle. As diferenças apresentadas são em relação ao agente desmetilante decitabina. Os valores de p foram determinados usando ANOVA de uma via, seguido de teste post hoc de Tukey (paramétricos), e teste de Kruskal-Wallis, seguido de teste de correlações múltiplas de Dunn (não paramétricos), utilizando $p < 0,05$ para determinar diferenças estatisticamente significativas. a $< 0,05$, b/** $< 0,01$, d $< 0,0001$; valores de p representados em letras são em relação à decitabina; valores de p representados em * são em relação ao quimioterápico isolado

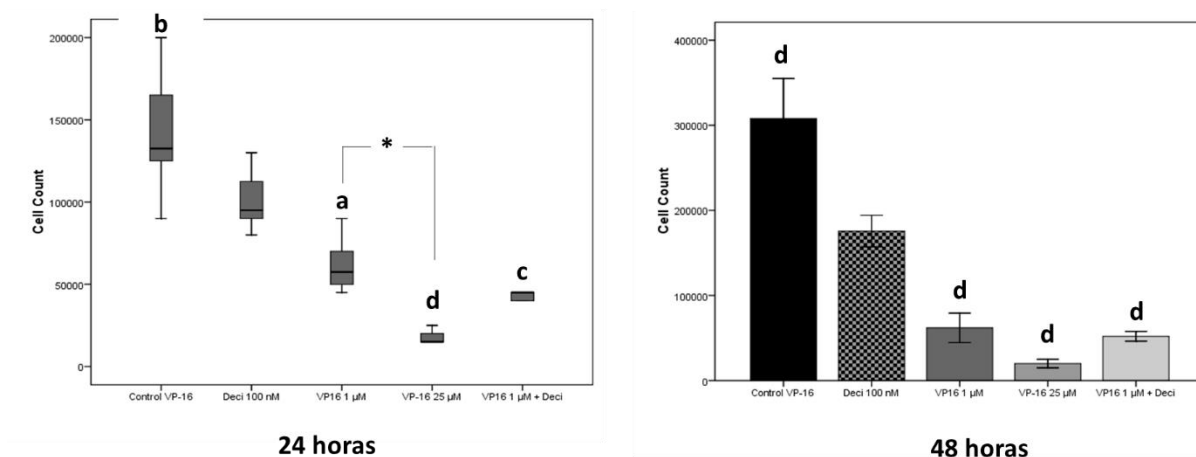


FIGURA 20: Contagem após 24 e 48 horas de tratamento com etoposídeo na linhagem RAJI. Todas as amostras apresentaram diferença significativa em relação ao controle. As diferenças apresentadas são em relação ao agente desmetilante decitabina. Os valores de p foram determinados usando ANOVA de uma via, seguido de teste post hoc de Tukey (paramétricos), e teste de Kruskal-Wallis, seguido de teste de correlações múltiplas de Dunn (não paramétricos), utilizando $p < 0,05$ para determinar diferenças estatisticamente significativas. a/* $< 0,05$, b $< 0,01$, c $< 0,001$, d $< 0,0001$; valores de p representados em letras são em relação à decitabina; valores de p representados em * são em relação ao quimioterápico isolado

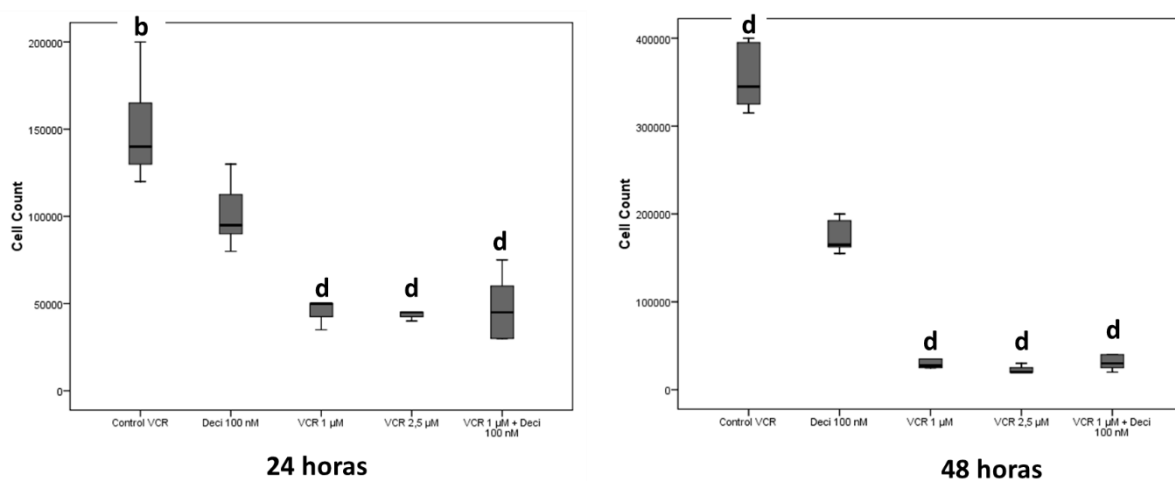


FIGURA 21: Contagem após 24 e 48 horas de tratamento com vincristina na linhagem RAJI. Todas as amostras apresentaram diferença significativa em relação ao controle. As diferenças apresentadas são em relação ao agente desmetilante decitabina. Os valores de p foram determinados usando teste de Kruskal-Wallis, seguido de teste de correlações múltiplas de Dunn, utilizando $p < 0,05$ para determinar diferenças estatisticamente significativas. b $< 0,01$, d $< 0,0001$

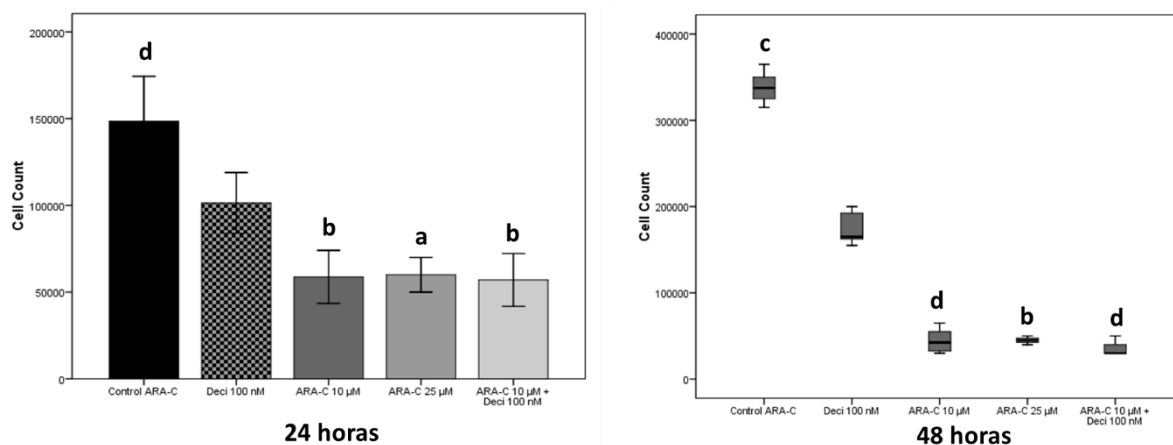


FIGURA 22: Contagem após 24 e 48 horas de tratamento com citarabina na linhagem RAJI. Todas as amostras apresentaram diferença significativa em relação ao controle. As diferenças apresentadas são em relação ao agente desmetilante decitabina. Os valores de p foram determinados usando ANOVA de uma via, seguido de teste post hoc de Tukey (paramétricos), e teste de Kruskal-Wallis, seguido de teste de correlações múltiplas de Dunn (não paramétricos), utilizando $p < 0,05$ para determinar diferenças estatisticamente significativas. a $< 0,05$, b $< 0,01$, c $< 0,001$, d $< 0,0001$

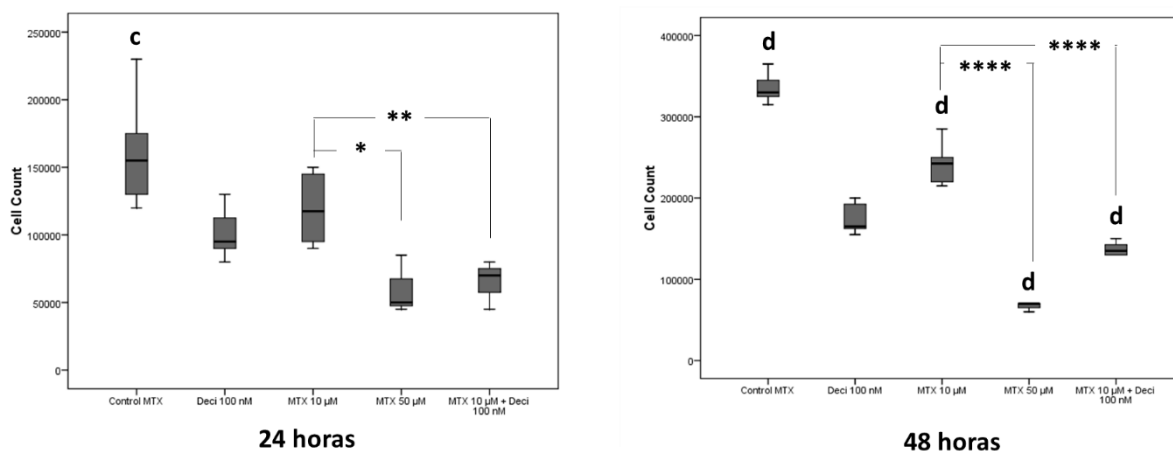


FIGURA 23: Contagem após 24 e 48 horas de tratamento com metotrexato na linhagem RAJI. Todas as amostras apresentaram diferença significativa em relação ao controle. As diferenças apresentadas são em relação ao agente desmetilante decitabina. Os valores de p foram determinados usando teste de Kruskal-Wallis, seguido de teste de correlações múltiplas de Dunn, utilizando $p < 0,05$ para determinar diferenças estatisticamente significativas. * $< 0,05$, ** $< 0,01$, c $< 0,001$, d/**** $< 0,0001$; valores de p representados em letras são em relação à decitabina; valores de p representados em * são em relação ao quimioterápico isolado

4.2 Avaliação da expressão gênica

Após 48 horas de tratamento com os quimioterápicos testados, foi realizada a extração de RNA para posterior síntese de cDNA e qPCR para análise da expressão gênica dos genes *IDH2*, *TET2*, *EZH2* e *KDM2B*.

Foram comparados os níveis de expressão gênica entre cada tratamento testado. Como objetivo principal, foram comparados os níveis de expressão gênica na associação do quimioterápico com a decitabina e o quimioterápico isolado, a fim de verificar se esta associação poderia promover uma modulação da expressão gênica diferente da observada com os tratamentos de forma isolada.

4.2.1 Avaliação da expressão gênica de *EZH2*

4.2.1.1 Linhagem K-562

Para o gene *EZH2* foi possível observar uma diminuição da expressão nos tratamentos com associação de doxorrubicina com decitabina ($p < 0,0001$) (Figura 24A) etoposídeo com decitabina ($p < 0,0001$) (Figura 24B) e vincristina com decitabina ($p < 0,0001$) (Figura 24C) quando comparados aos tratamentos de forma isolada. Já nos tratamentos de citarabina (Figura 24D) e metotrexato (Figura 24E) em associação com a decitabina os níveis de expressão não foram significativamente diferentes quando comparados ao tratamento do quimioterápico de forma isolada.

O tratamento com decitabina demonstrou aumento significativo da expressão gênica em relação ao controle ($p < 0,0001$) e em relação à associação ($p < 0,0001$) e ao quimioterápico isolado ($p < 0,0001$) (Figuras 24A-D). Apenas para o tratamento com metotrexato não foi possível observar diferenças significativas em relação ao tratamento com decitabina tanto na associação quanto no tratamento isolado (Figura 24E).

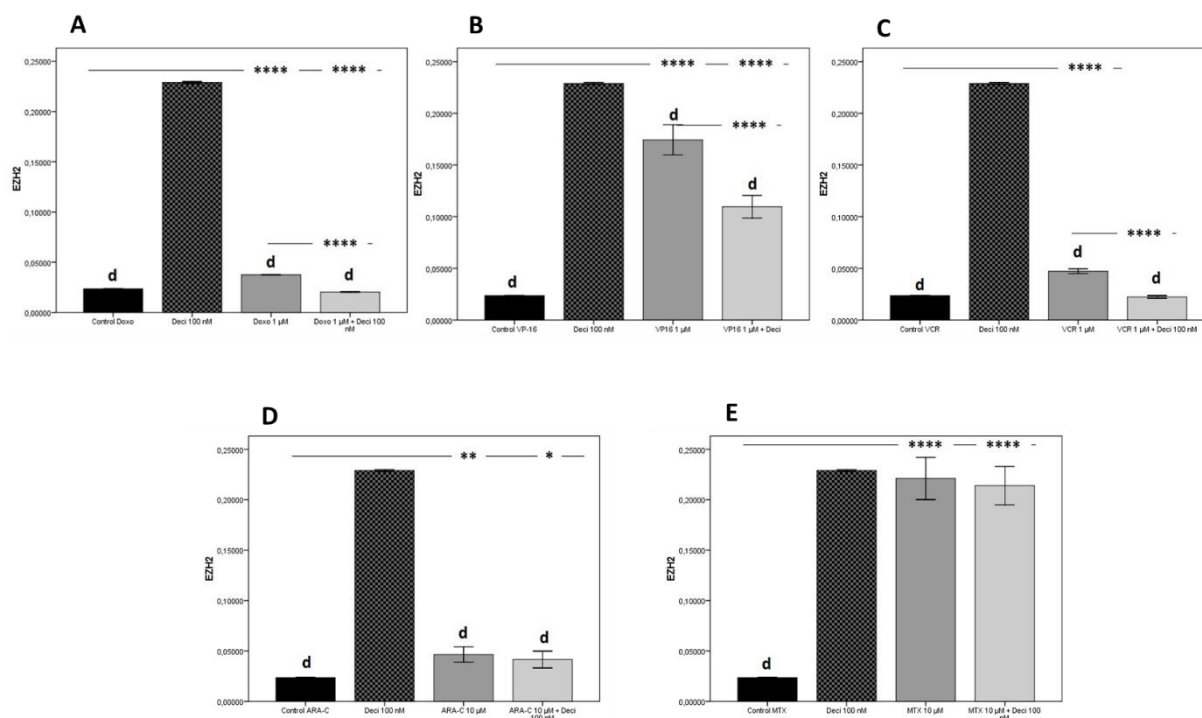


FIGURA 24: Nível de expressão do gene *EZH2* na linhagem K-562 no tratamento com (A) doxorubicina, (B) etoposídeo, (C) vincristina, (D) citarabina e (E) metotrexato. As diferenças apresentadas são em relação ao agente desmetilante decitabina. Os valores de p foram determinados usando ANOVA de uma via, seguido de teste post hoc de Tukey utilizando $p < 0,05$ para determinar diferenças estatisticamente significativas. a/* $< 0,05$, b/** $< 0,01$, c/** $< 0,001$, d/**** $< 0,0001$; valores de p representados em letras são em relação à decitabina; valores de p representados em * são em relação ao controle ou quimioterápico isolado.

4.2.1.2 Linhagem RAJI

A expressão gênica do *EZH2* apresentou um aumento significativo para os quimioterápicos doxorubicina ($p < 0,0001$) (Figura 25A) e vincristina ($p < 0,0001$) (Figura 25C) associados com decitabina em comparação com o quimioterápico isolado. Houve diminuição da expressão gênica para a associação com etoposídeo ($p < 0,0001$) (Figura 25B), citarabina ($p < 0,0001$) (Figura 25D) e metotrexato ($p < 0,0001$) (Figura 25E).

Para o tratamento com decitabina isolada não houve diferença significativa em duas replicatas (Figura 25A e 25C) e houve diferença significativa para as demais três

replicatas ($p < 0,01$) (Figura 25B, 25D e 25E). Na comparação da decitabina com o quimioterápico isolado, não houve diferença significativa no tratamento com doxorrubicina (Figura 25A) e vincristina (Figura 25C), houve aumento da expressão gênica para o etoposídeo isolado ($p < 0,0001$) (Figura 25B), citarabina isolada ($p < 0,0001$) (Figura 25D) e metotrexato isolado ($p < 0,0001$) (Figura 25E). Ainda, na comparação da decitabina com a associação, houve aumento significativo da expressão gênica na associação com doxorrubicina ($p < 0,0001$) (Figura 25A), vincristina ($p < 0,0001$) (Figura 25C) e metotrexato ($p < 0,0001$) (Figura 25E) e diminuição significativa para a associação com etoposídeo ($p < 0,0001$) (Figura 25B) e citarabina ($p < 0,0001$) (Figura 25C).

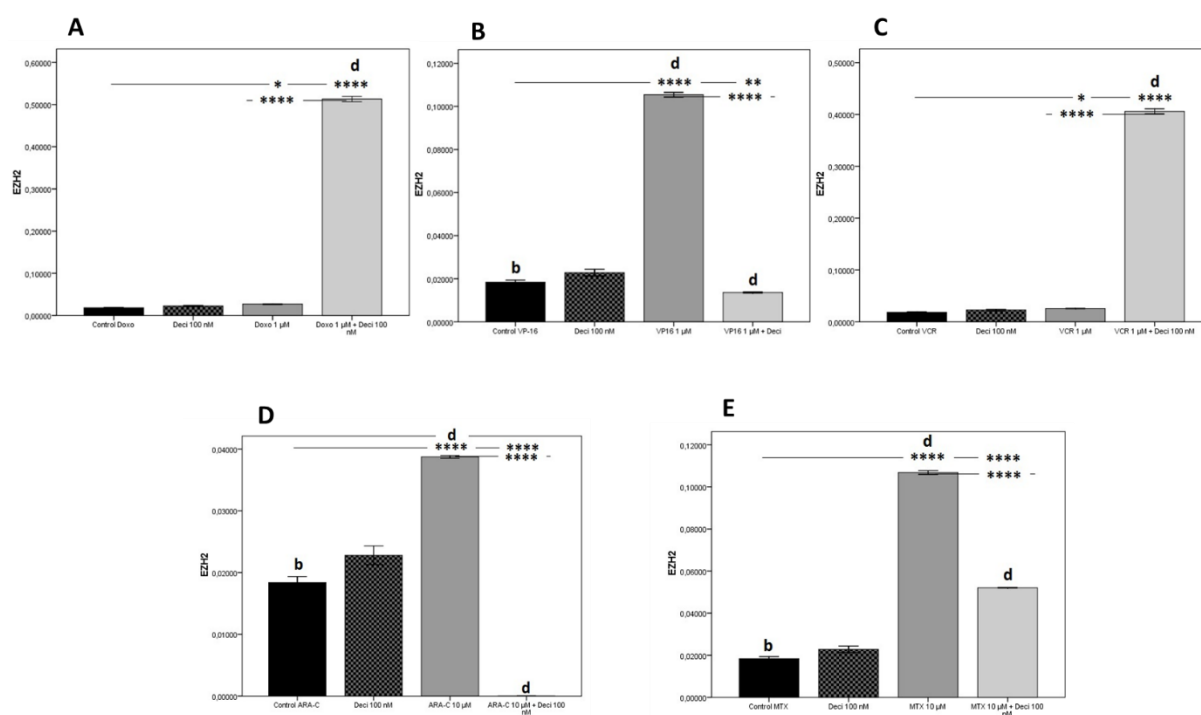


FIGURA 25: Nível de expressão do gene *EZH2* na linhagem RAJI no tratamento com (A) doxorrubicina, (B) etoposídeo, (C) vincristina, (D) citarabina e (E) metotrexato. As diferenças apresentadas são em relação ao agente desmetilante decitabina. Os valores de p foram determinados usando ANOVA de uma via, seguido de teste post hoc de Tukey utilizando $p < 0,05$ para determinar diferenças estatisticamente significativas. a/* $< 0,05$, b/** $< 0,01$, c/** $< 0,001$, d/**** $< 0,0001$; valores de p representados em letras são em relação à decitabina; valores de p representados em * são em relação ao controle ou quimioterápico isolado.

4.2.2 Avaliação da expressão gênica de *IDH2*

4.2.2.1 Linhagem KASUMI-1

A expressão gênica de *IDH2* foi significativamente elevada na associação com doxorrubicina ($p < 0,0001$) (Figura 26A), etoposídeo ($p < 0,0001$) (Figura 26B), vincristina ($p < 0,0001$) (Figura 26C) e metotrexato ($p < 0,0001$) (Figura 26E). Apenas no tratamento com citarabina houve uma diminuição significativa na expressão gênica ($p < 0,0001$) em comparação com o quimioterápico isolado (Figura 26D).

A expressão gênica do tratamento com decitabina em comparação ao controle foi significativamente menor ($p < 0,0001$ - $p < 0,05$) (Figuras 26^a, 26C-E). O tratamento com o quimioterápico apresentou aumento da expressão na doxorrubicina ($p < 0,0001$) (Figura 26A), vincristina ($p < 0,0001$) (Figura 26C) e citarabina ($p < 0,0001$) (Figura 26D). Apresentou diminuição da expressão no tratamento com metotrexato ($p < 0,0001$) (Figura 26E) e não apresentou diferença significativa no tratamento com etoposídeo em relação à decitabina (Figura 26B). A associação de quimioterápico com decitabina apresentou aumento da expressão em todos os tratamentos em relação à decitabina ($p < 0,0001$) (Figuras 26A-E).

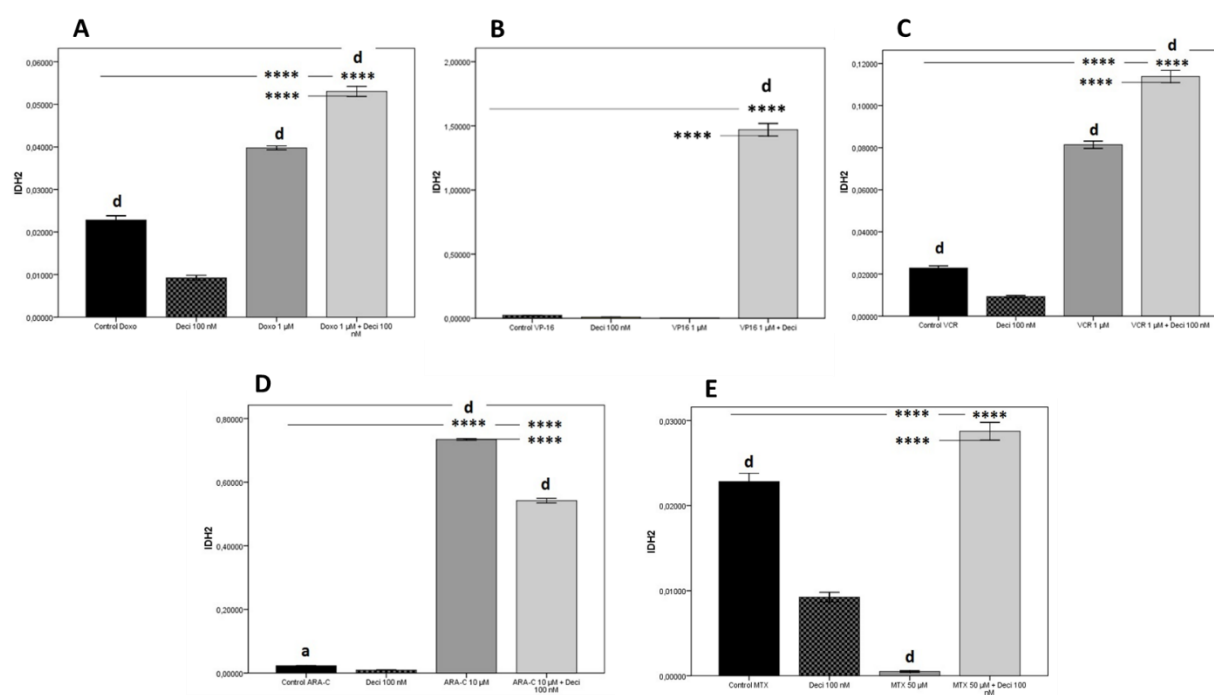


FIGURA 26: Nível de expressão do gene *IDH2* na linhagem KASUMI-1 no tratamento com (A)

doxorrubicina, (B) etoposídeo, (C) vincristina, (D) citarabina e (E) metotrexato. As diferenças apresentadas são em relação ao agente desmetilante decitabina. Os valores de p foram determinados usando ANOVA de uma via, seguido de teste post hoc de Tukey utilizando $p < 0,05$ para determinar diferenças estatisticamente significativas. a/* $< 0,05$, b/** $< 0,01$, c/*** $< 0,001$, d/**** $< 0,0001$; valores de p representados em letras são em relação à decitabina; valores de p representados em * são em relação ao controle ou quimioterápico isolado.

4.2.2.2 Linhagem K-562

Para a expressão gênica de *IDH2* foi possível observar uma diminuição significativa no tratamento da associação de doxorrubicina com decitabina ($p < 0,0001$) (Figura 27A) e citarabina com decitabina ($p < 0,0001$) (Figura 27D) em relação ao quimioterápico isolado. No tratamento de vincristina associado com decitabina houve um aumento significativo na expressão gênica ($p < 0,0001$) (Figura 27C) bem como na associação de etoposídeo ($p < 0,001$) (Figura 27B) e metotrexato ($p < 0,05$) (Figura 27E) em relação ao quimioterápico isolado.

Houve um aumento significativo da expressão gênica nos tratamentos com decitabina isolada em relação ao controle ($p < 0,0001$) (Figuras 27A-E). Este comportamento também foi observado em relação à associação com decitabina para os tratamentos com doxorrubicina, vincristina, citarabina e metotrexato ($p < 0,0001$) (Figuras 27A, 27C-E) e etoposídeo ($p < 0,01$) (Figura 27B). Ainda, a decitabina apresentou alta taxa de expressão em relação aos quimioterápicos de forma isolada ($p < 0,0001$) (Figura 27A-E).

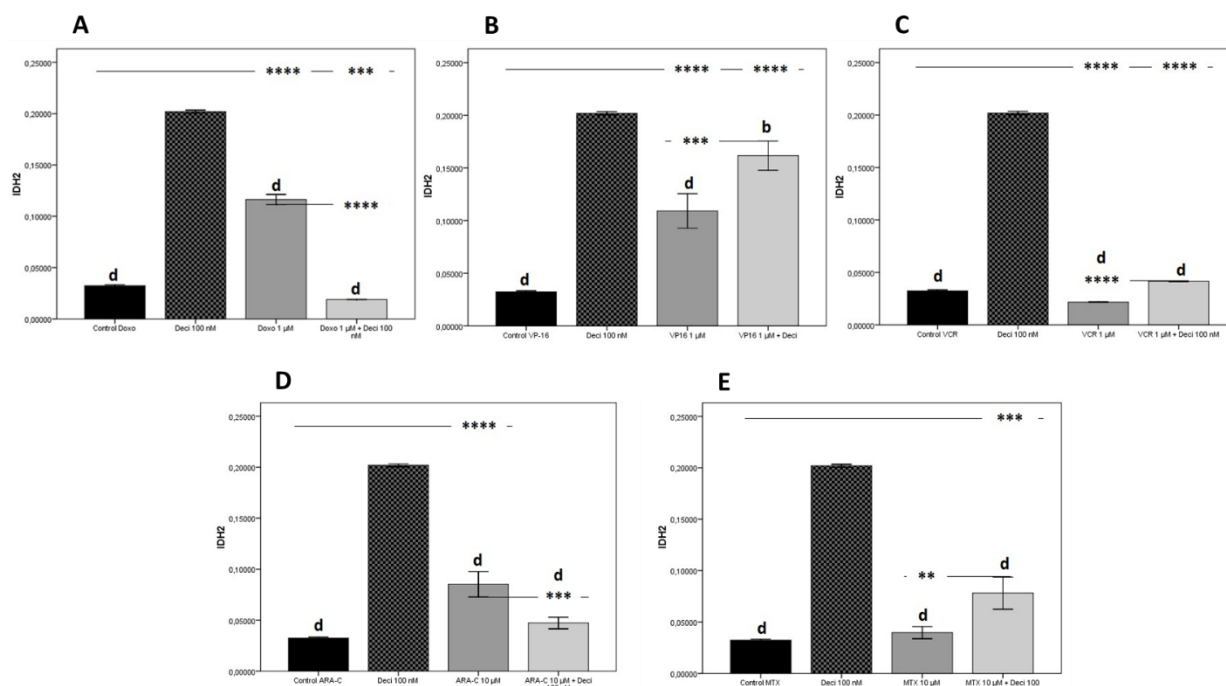


FIGURA 27: Nível de expressão do gene *IDH2* na linhagem K-562 no tratamento com (A) doxorrubicina, (B) etoposídeo, (C) vincristina, (D) citarabina e (E) metotrexato. As diferenças apresentadas são em relação ao agente desmetilante decitabina. Os valores de p foram determinados usando ANOVA de uma via, seguido de teste post hoc de Tukey utilizando $p < 0,05$ para determinar diferenças estatisticamente significativas. a/* $< 0,05$, b/** $< 0,01$, c/** $< 0,001$, d/**** $< 0,0001$; valores de p representados em letras são em relação à decitabina; valores de p representados em * são em relação ao controle ou quimioterápico isolado.

4.2.2.3 Linhagem RAJI

A expressão do gene *IDH2* foi significativamente elevada para os tratamentos com doxorrubicina ($p < 0,0001$) (Figura 28A) e citarabina ($p < 0,0001$) (Figura 28D) associados com decitabina em comparação com o quimioterápico isolado. Houve diminuição significativa da expressão gênica nos tratamentos com etoposídeo ($p < 0,0001$) (Figura 28B), vincristina ($p < 0,0001$) (Figura 28C) e metotrexato ($p < 0,0001$) (Figura 28E) associados com decitabina em relação ao quimioterápico isolado.

Em relação à expressão gênica, a decitabina apresentou baixa expressão gênica, com diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,0001$) (Figuras 28A-E). Na comparação da decitabina em relação ao quimioterápico isolado houve aumento significativo da expressão do *IDH2* no quimioterápico isolado ($p < 0,0001$)

(Figuras 28A-E). Ainda, na comparação da decitabina com a associação, houve aumento significativo da expressão gênica na associação com $p < 0,0001$ (Figuras 28A-B e 28D-E) e $p < 0,01$ (Figura 28C).

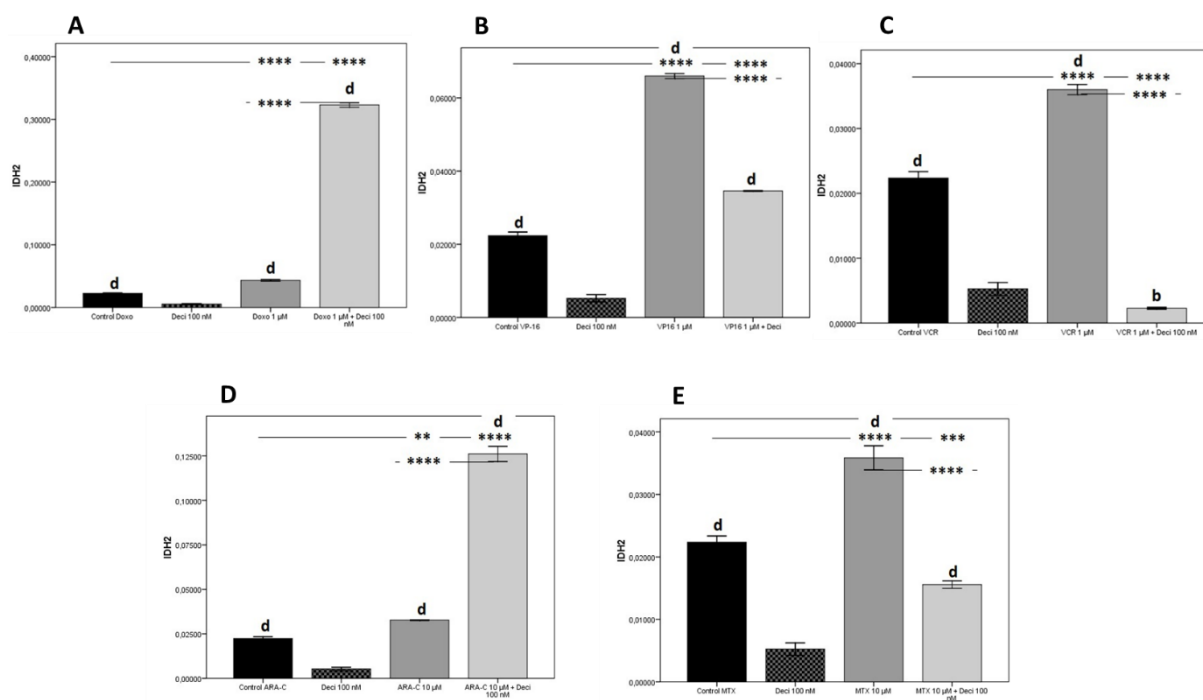


FIGURA 28: Nível de expressão do gene *IDH2* na linhagem RAJI no tratamento com (A) doxorrubicina, (B) etoposídeo, (C) vincristina, (D) citarabina e (E) metotrexato. As diferenças apresentadas são em relação ao agente desmetilante decitabina. Os valores de p foram determinados usando ANOVA de uma via, seguido de teste post hoc de Tukey utilizando $p < 0,05$ para determinar diferenças estatisticamente significativas. a/* $< 0,05$, b/** $< 0,01$, c/** $< 0,001$, d/**** $< 0,0001$; valores de p representados em letras são em relação à decitabina; valores de p representados em * são em relação ao controle ou quimioterápico isolado.

4.2.3 Avaliação da expressão gênica de *TET2*

4.2.3.1 Linhagem K-562

A expressão gênica do *TET2* na associação de quimioterápico com decitabina em comparação ao quimioterápico isolado, apresentou aumento significativo nos tratamentos de associação de doxorrubicina ($p < 0,0001$) (Figura 29A), etoposídeo ($p < 0,0001$) (Figura 29B) e metotrexato ($p < 0,0001$) (Figura 29E). A expressão gênica teve diminuição significativa para a associação de decitabina com vincristina ($p < 0,05$)

(Figura 29C) e citarabina ($p < 0,0001$) (Figura 29D).

A expressão gênica no tratamento com decitabina foi significativamente maior ($p < 0,0001$) em relação ao controle. Em comparação à associação, a decitabina apresentou baixa expressão gênica nos tratamentos com doxorrubicina ($p < 0,0001$) (Figura 29A), etoposídeo ($p < 0,0001$) (Figura 29B), vincristina ($p < 0,001$) (Figura 29C), metotrexato ($p < 0,0001$) (Figura 29E). Sendo apenas significativamente maior para o tratamento com citarabina ($p < 0,0001$) (Figura 29D). Em comparação ao quimioterápico isolado, para doxorrubicina, etoposídeo e citarabina não houve diferença significativa (Figura 29A-B e 29D), no tratamento com vincristina houve aumento da expressão gênica ($p < 0,0001$) (Figura 29C), e ainda, no tratamento com metotrexato houve diminuição da expressão gênica ($p < 0,0001$) (Figura 29E).

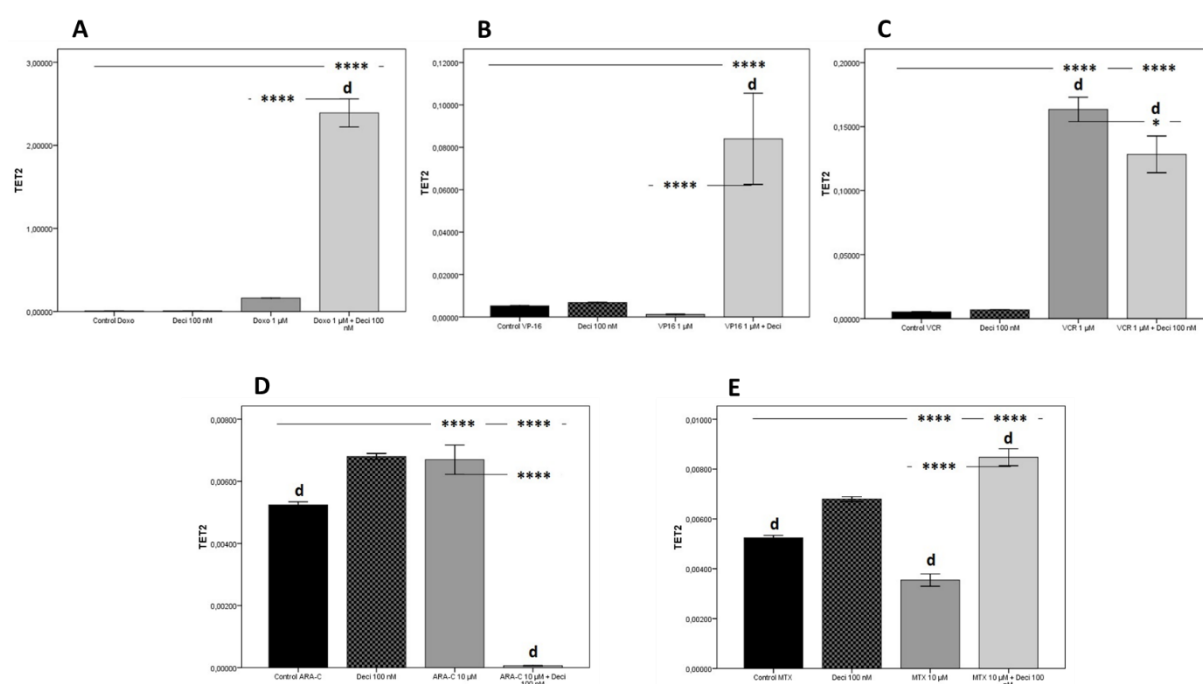


FIGURA 29: Nível de expressão do gene *TET2* na linhagem K-562 no tratamento com (A) doxorrubicina, (B) etoposídeo, (C) vincristina, (D) citarabina e (E) metotrexato. As diferenças apresentadas são em relação ao agente desmetilante decitabina. Os valores de p foram determinados usando ANOVA de uma via, seguido de teste post hoc de Tukey utilizando $p < 0,05$ para determinar diferenças estatisticamente significativas. a/* $< 0,05$, b/** $< 0,01$, c/** $< 0,001$, d/**** $< 0,0001$; valores de p representados em letras são em relação à decitabina; valores de p representados em * são em relação ao controle ou quimioterápico isolado.

4.2.3.2 Linhagem RAJI

Na expressão gênica de *TET2* houve aumento significativo na expressão gênica na associação com decitabina em todos os quimioterápicos testados ($p < 0,0001$) (Figuras 30A-E).

A expressão gênica no tratamento com decitabina isolada em comparação ao controle não apresentou diferença significativa (Figuras 30A-E). A expressão gênica no tratamento com decitabina em comparação com o quimioterápico isolado não apresentou diferença significativa no tratamento com doxorrubicina (Figura 30A) e vincristina (Figura 30C) e apresentou aumento significativo no tratamento com etoposídeo ($p < 0,0001$) (Figura 30B), citarabina ($p < 0,05$) (Figura 30D) e metotrexato ($p < 0,0001$) (Figura 30E). A comparação com decitabina e a associação apresentou aumento significativo da expressão para todas as associações ($p < 0,0001$) (Figuras 30A-E).

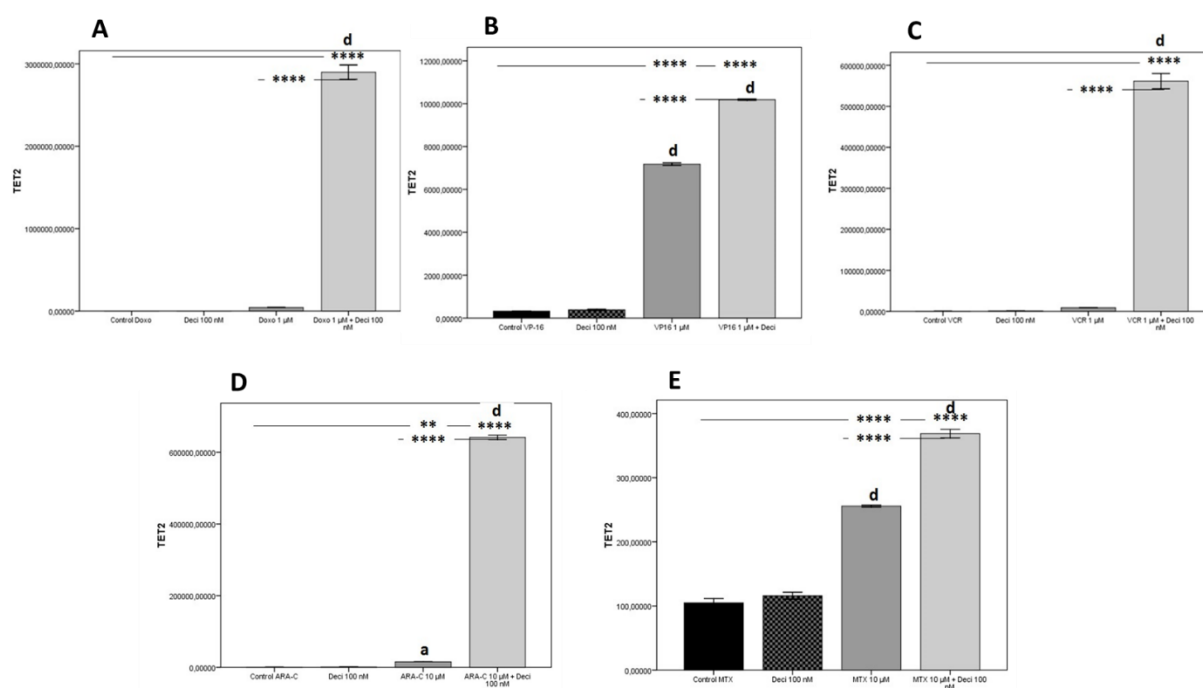


FIGURA 30: Nível de expressão do gene *TET2* na linhagem RAJI no tratamento com (A) doxorrubicina, (B) etoposídeo, (C) vincristina, (D) citarabina e (E) metotrexato. As diferenças apresentadas são em relação ao agente desmetilante decitabina. Os valores de p foram determinados usando ANOVA de uma via, seguido de teste post hoc de Tukey utilizando $p < 0,05$ para determinar diferenças estatisticamente significativas. a/* $< 0,05$, b/** $< 0,01$, c/*** $< 0,001$, d/**** $< 0,0001$; valores de p representados em letras são em relação à decitabina; valores de p representados em * são em relação ao controle ou quimioterápico isolado.

4.2.4 Avaliação da expressão gênica de *KDM2B*

4.2.4.1 Linhagem KASUMI-1

A expressão gênica de *KDM2B* foi significativamente elevada nos tratamentos com doxorubicina ($p < 0,0001$) (Figura 31A), etoposídeo ($p < 0,0001$) (Figura 31B) e citarabina ($p < 0,0001$) (Figura 31D) e significativamente baixa nos tratamentos com vincristina ($p < 0,0001$) (Figura 31C) e metotrexato ($p < 0,0001$) (Figura 31E) associados com decitabina em comparação ao quimioterápico isolado.

A expressão gênica do tratamento com decitabina em comparação ao controle foi significativamente elevada ($p < 0,0001$) (Figuras 31A-E). O tratamento com o quimioterápico isolado apresentou expressão significativamente baixa ($p < 0,0001$) (Figuras 31A-D) em relação à decitabina, com exceção do metotrexato, que foi significativamente elevado ($p < 0,0001$) (Figura 31E) em relação à decitabina. A associação de quimioterápico com decitabina foi baixa no tratamento com doxorubicina ($p < 0,0001$) (Figura 31A), vincristina ($p < 0,0001$) (Figura 31C), citarabina ($p < 0,0001$) (Figura 31D) e alta no tratamento com etoposídeo ($p < 0,0001$) (Figura 31B) em relação à decitabina. No tratamento com metotrexato não houve diferença significativa entre a associação e a decitabina (Figura 31E)

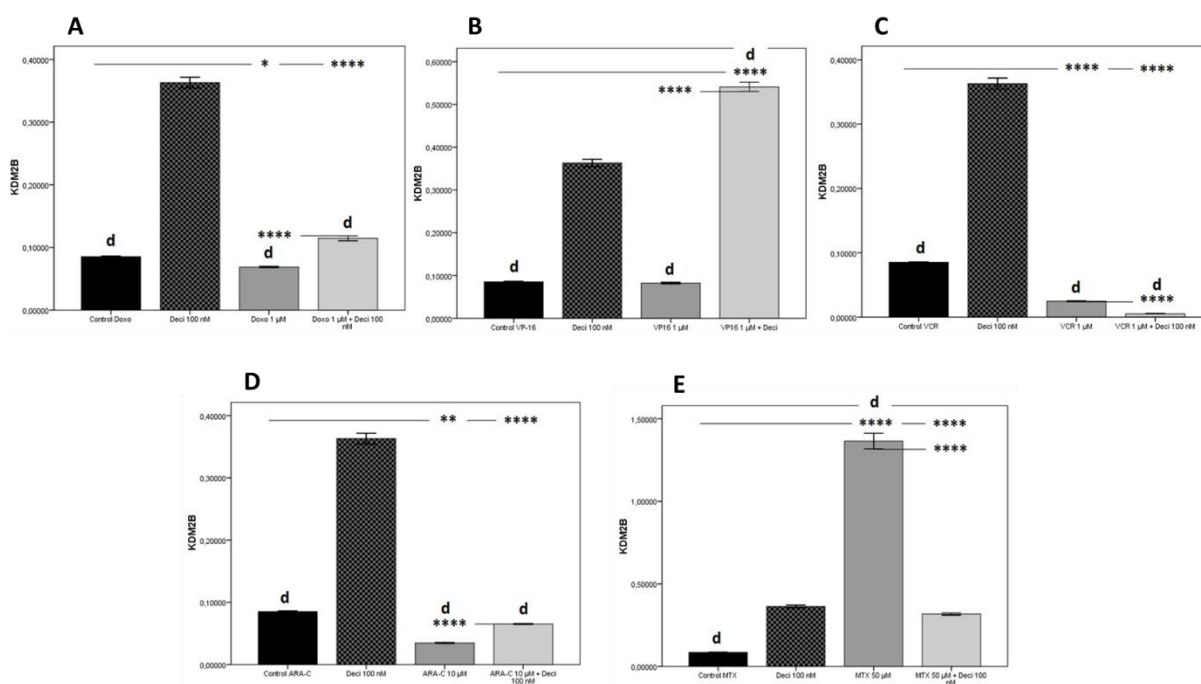


FIGURA 31: Nível de expressão do gene *KDM2B* na linhagem KASUMI-1 no tratamento com (A) doxorrubicina, (B) etoposídeo, (C) vincristina, (D) citarabina e (E) metotrexato. As diferenças apresentadas são em relação ao agente desmetilante decitabina. Os valores de p foram determinados usando ANOVA de uma via, seguido de teste post hoc de Tukey utilizando $p < 0,05$ para determinar diferenças estatisticamente significativas. a/* $< 0,05$, b/** $< 0,01$, c/** $< 0,001$, d/**** $< 0,0001$; valores de p representados em letras são em relação à decitabina; valores de p representados em * são em relação ao controle ou quimioterápico isolado.

4.2.4.2 Linhagem K-562

A expressão gênica de *KDM2B* foi significativamente baixa nos tratamentos de doxorrubicina ($p < 0,0001$) (Figura 32A), vincristina ($p < 0,0001$) (Figura 32C), citarabina ($p < 0,0001$) (Figura 32D) e metotrexato ($p < 0,0001$) (Figura 32E) associados com decitabina em comparação ao quimioterápico isolado. No tratamento com etoposídeo associado com decitabina em comparação ao quimioterápico isolado, houve um aumento da expressão gênica ($p < 0,0001$) (Figura 32B).

A expressão gênica do tratamento com decitabina em comparação ao controle não apresentou diferença significativa (Figuras 32A-E). O tratamento com o quimioterápico isolado apresentou aumento significativo da expressão gênica em comparação com a decitabina ($p < 0,0001$) (Figuras 32A-E).

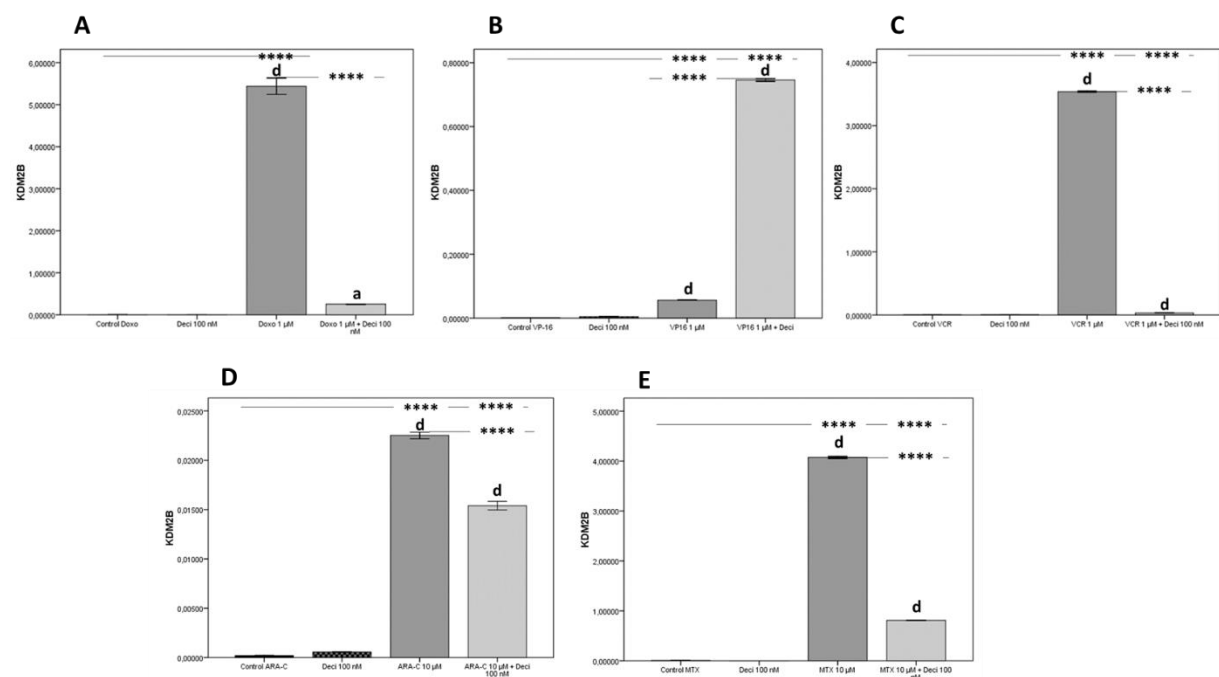


FIGURA 32: Nível de expressão do gene *KDM2B* na linhagem K-562 no tratamento com (A) doxorrubicina, (B) etoposídeo, (C) vincristina, (D) citarabina e (E) metotrexato. As diferenças apresentadas são em relação ao agente desmetilante decitabina. Os valores de p foram determinados usando ANOVA de uma via, seguido de teste post hoc de Tukey utilizando $p < 0,05$ para determinar diferenças estatisticamente significativas. a/* $< 0,05$, b/** $< 0,01$, c/*** $< 0,001$, d/**** $< 0,0001$; valores de p representados em letras são em relação à decitabina; valores de p representados em * são em relação ao controle ou quimioterápico isolado.

4.2.4.3 Linhagem RAJI

A expressão gênica do *KDM2B* apresentou aumento significativo para os tratamentos com etoposídeo ($p < 0,0001$) (Figura 33B), vincristina ($p < 0,0001$) (Figura 33C) e citarabina ($p < 0,0001$) (Figura 33D) associados à decitabina em relação ao quimioterápico isolado. Houve uma diminuição da expressão gênica nos tratamentos de associação com doxorrubicina ($p < 0,0001$) (Figura 33A) e metotrexato ($p < 0,0001$) (Figura 33E).

Os níveis de expressão no tratamento com decitabina foram baixos, sendo que para três replicatas houve diferença significativa, onde o controle apresentou aumento da expressão gênica ($p < 0,0001$) em relação à decitabina (Figuras 33A-B, 33E). As demais replicatas não apresentaram diferença significativa. Em relação ao quimioterápico isolado, a decitabina apresentou baixa expressão gênica para doxorrubicina ($p < 0,0001$) (Figura 33A), etoposídeo ($p < 0,0001$) (Figura 33B), citarabina ($p < 0,0001$) (Figura 33D) e metotrexato ($p < 0,0001$) (Figura 33E). Apenas no tratamento com vincristina não houve diferença significativa em relação à decitabina (Figura 33C). Ainda, na comparação da decitabina com a associação, não houve diferença significativa no tratamento com doxorrubicina (Figura 33A), e houve aumento na expressão gênica com o tratamento em associação para o etoposídeo ($p < 0,0001$) (Figura 33B), vincristina ($p < 0,0001$) (Figura 33C), citarabina ($p < 0,0001$) (Figura 33D) e metotrexato ($p < 0,0001$) (Figura 33E).

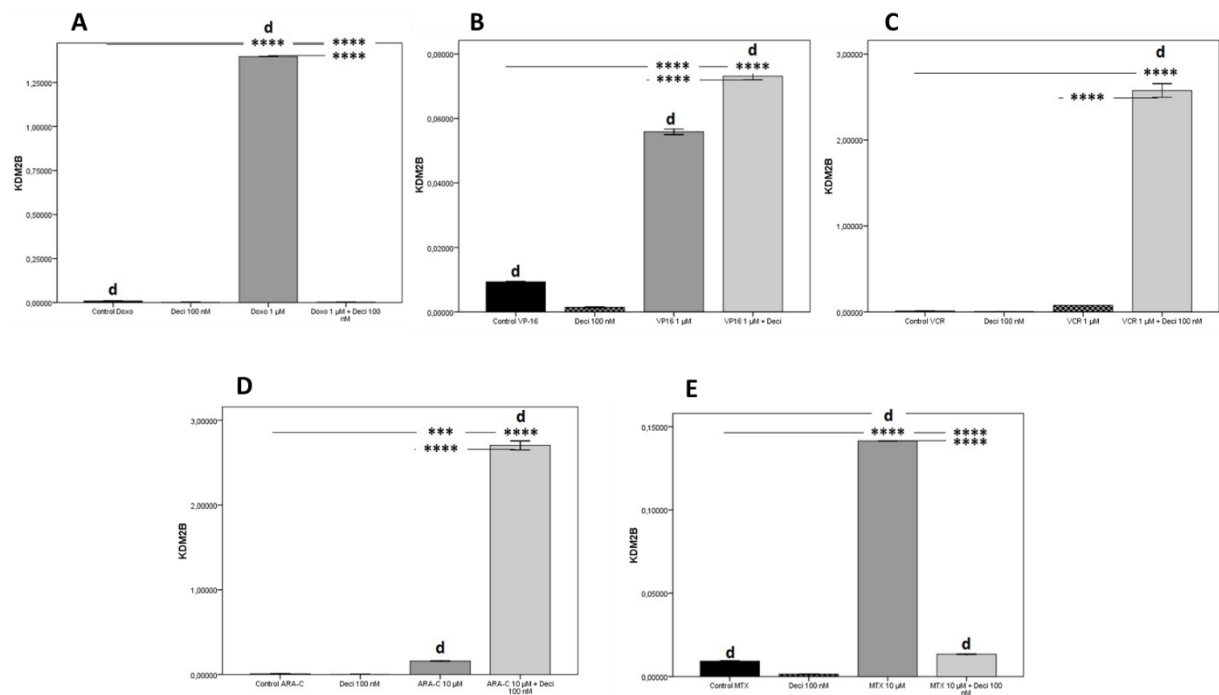


FIGURA 33: Nível de expressão do gene *KDM2B* na linhagem RAJI no tratamento com (A) doxorrubicina, (B) etoposídeo, (C) vincristina, (D) citarabina e (E) metotrexato. As diferenças apresentadas são em relação ao agente desmetilante decitabina. Os valores de p foram determinados usando ANOVA de uma via, seguido de teste post hoc de Tukey utilizando $p < 0,05$ para determinar diferenças estatisticamente significativas. a/* $< 0,05$, b/** $< 0,01$, c/*** $< 0,001$, d/**** $< 0,0001$; valores de p representados em letras são em relação à decitabina; valores de p representados em * são em relação ao controle ou quimioterápico isolado.

5. DISCUSSÃO

A decitabina é um potente agente desmetilante, capaz de induzir a hipometilação associada com a reativação de diversos genes. É utilizada no tratamento da SMD e da LMA com efeitos promissores, porém, não totalmente curativos, apresentando limitações, como resposta em apenas metade dos pacientes e remissão completa em menos da metade dos pacientes (JOECKE et al., 2012; SANTINI et al., 2001; YANG et al., 2006; KANTARJIAN et al., 2006; LÜBBERT et al., 2011; KANTARJIAN et al., 2007). Estudos clínicos têm demonstrado que a combinação de regimes terapêuticos incluindo a decitabina podem apresentar resultados satisfatórios (KIRSCHBAUM et al., 2014; WANG et al., 2014; BENTON et al., 2014; LI et al., 2014). Ainda, atualmente existem cerca de 33 estudos clínicos em andamento para leucemias e 3 para linfomas utilizando a combinação de decitabina com outras drogas (ClinicalTrials.gov).

Foi realizada a avaliação da proliferação celular a partir do método de azul de Tripan. Para todas as linhagens testadas, foi observado que, em 48 horas após o tratamento com decitabina, houve maior diminuição da contagem celular em relação à contagem em 24 horas. Ainda, após 48 horas houve diferença significativa entre as doses, com menor contagem celular de acordo com o aumento da dose administrada. A partir da contagem celular, pode-se observar uma concentração dose-dependente, como observado em outro estudo de Geng et al. (2016) a partir de linhagens celulares SKM-1 e Kg-1a, para SMD e LMA, respectivamente.

A decitabina afeta a expressão de receptores de ativação e inibição de células NK em baixas concentrações quando exposta durante a proliferação celular. Em

altas doses, diminui a proliferação de células NK e a viabilidade, através da inibição direta de transcrição do RNA mensageiro, levando a uma resposta bifásica na hipometilação e citotoxicidade. Sendo assim, a imunomodulação com decitabina ocorre em baixas doses (KOPP et al., 2013).

Um estudo clínico para pacientes com tumor refratário avançado, incluindo linfomas, foi realizado em regime de baixa dose de decitabina com quimioimunoterapia, demonstrando um perfil aceitável de segurança e permitindo uma resposta ao tratamento nestes pacientes (FAN et al., 2014). Ainda, Gao et al. (2015) demonstraram que a decitabina sozinha ou combinada com aclarubicina + Ara-C + G-CSF (fator estimulador de colônias granulocitárias) pode apresentar melhores resultados para LMA/SMD com cariótipo complexo. É importante ressaltar que o pré-tratamento com agentes desmetilantes de DNA, como a decitabina, sensibiliza as células cancerígenas para a ação de inibidores de topoisomerase como doxorrubicina, etoposídeo, irinotecan e mitoxantrona, reduzindo dessa forma, a viabilidade celular e a capacidade de proliferação. Este processo permite que a morte celular programada possa ocorrer de maneira mais efetiva do que quando são utilizados os componentes de forma isolada (PAWLAK et al., 2016; SU et al., 2013; MIRZA et al., 2010).

No presente estudo foi possível observar um melhor desempenho da associação do quimioterápico com a decitabina em comparação ao quimioterápico de mesma dose isolado. Ou seja, uma menor contagem celular, na linhagem K-562 tratada com etoposídeo e com vincristina após 48 horas, e na linhagem RAJI tratada com metotrexato após 48 horas. Isto demonstra, possivelmente, a capacidade de sensibilização da célula ao quimioterápico provocada pela decitabina. Este comportamento não foi encontrado na linhagem KASUMI-1, podendo ser explicado pelo fato de apenas uma fração dos pacientes com LMA e Leucemia Mielomonocítica Crônica (LMMC) responderem a tratamentos com agentes hipometilantes, como a decitabina e a azacitidina (YANG et al., 2010). Swerev et al. (2016) observaram que a atividade da decitabina inibe o crescimento de linhagem celular de LH clássico a partir da regulação de genes associados à progressão do ciclo celular.

A doxorrubicina pertence à família de antraciclinas e possui um amplo espectro de atividade. Sua utilização tem demonstrado bons resultados no tratamento de tumores sólidos, mieloma múltiplo e LMA (TACAR et al., 2013). Esta droga pode

induzir a apoptose em células leucêmicas *in vivo* e *in vitro*, porém já foram observadas resistências à droga a partir de mecanismos ainda não elucidados (LERMA-DIAZ et al., 2006; BROXTERMAN et al., 2009). Um estudo realizado a partir de nanopartículas contendo decitabina e doxorrubicina associadas demonstrou que as duas drogas introduzidas simultaneamente apresentaram maior efeito repressor do crescimento das células de adenocarcinoma de mama e tumor epitelial do que quando comparadas ao efeito de cada droga isolada, sendo que a razão de células apoptóticas foi também maior nos quimioterápicos associados do que quando isolados (SU et al., 2013).

No presente estudo, não houve diferença significativa entre a associação de decitabina com doxorrubicina em comparação ao tratamento isolado para as linhagens KASUMI-1 e RAJI. Para a linhagem K-562 houve diferença significativa entre a associação e o tratamento isolado de 1 μ M em 24 horas. A linhagem K-562, resistente ao Imatinibe, pode apresentar multiresistência de forma independente ao gene de fusão BCR-ABL1 (LEE et al., 2007). Synowiec et al. (2015) observaram que a doxorrubicina na concentração de 1 μ M induziu apoptose em todas as linhagens celulares, apresentando ou não o gene de fusão.

O etoposídeo é um inibidor de topoisomerase II e é utilizado para o tratamento de LH, LNH, LMA, carcinoma de pequenas células de pulmão e tumores testiculares. Esta droga tem efeito mielossupressor, sendo necessário um controle rígido da contagem de células sanguíneas para evitar sua queda demasiada provocando neutropenia febril (ANVISA, 2016). Tang et al. (2014) investigaram níveis de expressão e metilação da região promotora de miR-720 e sua associação com características biológicas de leucemia. Pacientes com LMA apresentaram baixa expressão de miR-720 quando comparados a controles normais, ainda, o nível de metilação de miR-720 estava mais elevado nos casos de LMA. Em células da linhagem KASUMI-1, uma alta expressão do miR-720 levou a um aumento significativo dos níveis de apoptose, maior sensibilidade a apoptose induzida por etoposídeo e também, redução na proliferação celular. Após as células da linhagem KASUMI-1 serem tratadas com 1 μ M de decitabina por 48 horas, houve redução da metilação da região promotora de miR-720, elevando seus níveis de expressão. De forma semelhante, outro estudo analisou a expressão e metilação do miR-663 em leucemia. Foram utilizadas diferentes linhagens celulares, como RAJI, Jurkat SHI-1, CCRF, MV4-11 bem como amostras de pacientes. As células foram tratadas com 5

ou 10 μM de decitabina e o DNA e RNA foram extraído após 72 horas de tratamento para análise (YAN-FANG et al., 2013).

No presente estudo, não houve diferença significativa na contagem celular da associação de decitabina com etoposídeo em comparação ao tratamento isolado nas linhagens RAJI e KASUMI-1, em 24 horas e 48 horas. Isto pode ter ocorrido devido ao curto prazo de tempo de observação da contagem celular no presente estudo, já que de acordo com o estudo de Tang et al. (2014) a variação da expressão gênica e padrão de metilação ocorreu apenas após 48 horas. Desta forma, uma diminuição significativa da contagem de células tratadas com associação de decitabina e etoposídeo poderia ser observada nestas linhagens após este período, como por exemplo 72 horas após o tratamento, em comparação aos tratamentos isolados. Já para linhagem K-562 após 48 horas de tratamento, houve uma diferença significativa entre a dose mais baixa de 1 μM e a associação desta dose com decitabina, o que pode ser explicado pelo fato de ser uma linhagem crônica, onde as células podem apresentar uma maior atividade em relação às células imaturas da linhagem aguda, podendo assim, responder de forma um pouco mais antecipada.

A citarabina é uma das principais drogas para o tratamento da LMA há décadas. Porém, existem questões ainda não bem resolvidas como o valor terapêutico de suas altas doses e a relação dose-efeito. Assim, ainda não está estabelecido se doses intermediárias poderiam ser tão eficientes quanto altas doses, porém com efeitos tóxicos diminuídos (LÖWENBERG et al., 2013). A decitabina combinada com citarabina em pacientes com LMA apresentou uma sobrevida global maior que o grupo controle. Além disso, a taxa de resposta, sobrevida livre de progressão, e sobrevida livre de doença foram melhores no grupo com a associação com decitabina (NIETO et al., 2016). Jiang et al. (2015) investigaram o efeito do pré-tratamento com decitabina na suscetibilidade a quimioterápicos em células KASUMI-1, HL60/ADR e células primárias de LMA. O efeito citotóxico foi aumentado pela decitabina através da ativação de vias de sinalização. Para as células da linhagem KASUMI-1, foi demonstrado que a decitabina aumentou a sensibilidade para aclarrubicina e citarabina e também aumentou os níveis de apoptose nesta linhagem, sugerindo que a decitabina aumenta o efeito citotóxico de aclarrubicina e citarabina nesta linhagem, caracterizada como quimiorresistente. Este efeito não foi observado em nenhuma das linhagens utilizadas, incluindo a KASUMI-1. Isto pode ser devido ao tratamento e sua

duração. No estudo de Jiang et al. (2015) foi utilizado 1 μ M de decitabina sendo adicionado um novo tratamento de decitabina a cada dia, durante 72 horas de tratamento.

No presente estudo foi realizado apenas um tratamento de decitabina 100 nM, não sendo adicionados novas doses diariamente. Além disso, o período avaliado foi de 48 horas, podendo interferir nos resultados encontrados na contagem celular, demonstrando que este período não foi suficiente para que a associação de decitabina com citarabina apresentasse maior citotoxicidade em comparação aos tratamentos isolados.

A vincristina é um alcaloide da vinca que tem por função pausar a mitose na fase de metáfase e é utilizada como quimioterápico em diferentes tipos de câncer, incluindo leucemia linfoblástica aguda e LNH (NCCN, 2016). Já foi descrito que baixas doses de vincristina reduziram a metilação em cultura de células de adenocarcinoma de pulmão (NYCE et al., 1989), e em células de adenocarcinoma colorretal (MOON, et al., 2014). Porém, estes efeitos relacionados à atividade de vincristina não estão completamente elucidados. Em estudo realizado por Kothari et al. (2016) foi demonstrado que este alcaloide pode induzir diferentes programas de morte em células de LLA dependendo da fase do ciclo celular. Ainda, a vincristina demonstrou induzir morte celular sem parada mitótica em cultura primária de células de LLA em concentração de quimioterápico de 100 nM.

No presente estudo, não houve diferença na contagem celular na associação de decitabina com vincristina em comparação ao tratamento isolado nas linhagens KASUMI-1 e RAJI. A linhagem K-562 apresentou diferença significativa entre a associação em relação ao tratamento isolado com dose de 1 μ M após 48 horas. Como já observado em estudos com decitabina, a comparação de dose em tratamentos demonstrou mais efetividade em baixas doses, assim, a otimização da terapia pode incluir a redução da dose para favorecer a atividade hipometilante em relação à citotoxicidade (ISSA et al., 2004). Desta forma, pode ter ocorrido um evento semelhante neste estudo em comparação com o estudo de Kothari et al. (2016), onde foi utilizada uma dose menor de quimioterápico. Além disso, podem ter ocorrido diferenças em função da linhagem utilizada, já que para o estudo de Kothari et al. foram utilizadas células de LLA e no presente estudo foram células da linhagem

mieloide aguda. Porém, para a linhagem de LMC foi possível observar diferença na contagem de células.

Dados sugerem que neoplasias mieloides, tais como SMD, LMA e LMC, são as mais sensíveis aos inibidores da metilação do DNA. Não existem evidências que possam comprovar esta relação. Estudos mais antigos demonstram uma menor atividade destes inibidores em tumores sólidos, porém, deve-se observar que a dose utilizada foi mais elevada e o tempo de exposição reduzido, fatores que podem não demonstrar a total eficácia da droga nos diferentes tipos de câncer, aparentemente (ABELE et al., 1987; ISSA, 2007). Desta forma, torna-se necessária a avaliação em diversos tempos de tratamento e diferentes doses para cada doença a fim de definir o melhor regime de forma individualizada.

O metotrexato tem atividade no tratamento de LNH. É um anti-folato, porém apresenta mielossupressão dose-limitante por deprimir a hematopoiese e mucosite (SARRIS et al., 2002; WANG et al., 2003). No presente estudo, não houve diferença significativa na contagem celular na associação de decitabina com metotrexato em comparação ao tratamento isolado nas linhagens KASUMI-1 e K-562. Para a linhagem RAJI, tanto em 24 horas quanto em 48 horas houve diferença significativa da associação em relação à dose mais baixa de 10 μ M. Estes resultados vão de encontro com a atividade do metotrexato para LNH, o qual é utilizado para o tratamento da referida doença podendo causar mielossupressão. Este quimioterápico apresenta efeito antiproliferativo em linhagem celular de linfoma (PARK et al., 2007).

A comparação dos tratamentos entre 24 e 48 horas demonstra que no espaço entre estes dois períodos podem ocorrer diferenças na viabilidade celular. Ainda, podem ocorrer modificações epigenéticas que se relacionem com eventos ocorridos na clínica, como resposta ou refratariedade, toxicidade ao tratamento, entre outros. Neste estudo, o objetivo foi a detecção de possíveis modificações na expressão gênica antes de uma manifestação clara de fenótipo. Desta forma, o estudo de modificações na expressão gênica e padrões epigenéticos que ocorrem durante o tratamento podem direcionar o regime terapêutico utilizado e auxiliar na escolha da droga e dose, evitando os eventos adversos sérios. Ainda, a alteração precoce de padrões de expressão pode ser avaliada como marcador na clínica.

A desmetilação do DNA pode reverter a hipermetilação de regiões promotoras de genes de células tumorais, fazendo assim, com que genes silenciados durante o processo de tumorigênese possam voltar a serem expressos. Este evento pode, consequentemente, induzir sensibilidade nas células tumorais às drogas antitumorais (PEEDICAYIL, et al., 2012). No presente estudo pode ser observado um aumento de expressão gênica nos diferentes genes e linhagens utilizadas após o tratamento de forma isolada com a decitabina, demonstrando seu papel de reativação de genes silenciados. As doenças onco-hematológicas, bem como outros tipos de câncer em geral, já foram descritas por apresentar um padrão de metilação aberrante, refletindo em uma expressão gênica alterada, podendo levar tanto a uma maior expressão quanto supressão da expressão gênica. Ainda, este processo pode estar relacionado com diferentes eventos da carcinogênese, desde seu desenvolvimento, prognóstico, estadiamento e resposta ao tratamento (ZHANG et al., 2016; KRISTENSEN et al., 2016; ZHOU et al., 2016; JANCZAR et al., 2017).

A decitabina é um agente desmetilante amplamente estudado. Porém, sua desvantagem é devido a sua instabilidade, sendo que em cultura celular, sua meia vida é de aproximadamente 17 horas e *in vivo*, 10 a 35 minutos. A depleção de DNMT1 é o principal mecanismo de ação desta droga, e este efeito transitório não permite a depleção de forma sustentada. Por isso, um tratamento que permita a ação da decitabina por mais tempo pode ser importante para evitar a resistência à terapia (BOUMBER et al., 2011; COVEY et al., 1984; BROWN et al., 2004; GROS et al., 2012; MUND et al., 2005; VIJAYARAGHAVALU et al., 2013). Isto pode explicar o fato que nem todos os tratamentos apresentaram uma diferença significativa da expressão gênica entre o controle e o tratamento isolado com decitabina, já que esta análise foi realizada após 48 horas do tratamento e, neste período, poderia estar ocorrendo uma queda na atividade desmetilante.

Por apresentar uma capacidade de modulação da expressão gênica e ainda, por não ser amplamente discutida a sua utilização nas diferentes doenças onco-hematológicas e também sua associação com diferentes quimioterápicos, buscou-se verificar se a expressão dos genes *EZH2*, *IDH2*, *KDM2B* e *TET2* apresentaria alteração após tratamento com as diferentes associações de quimioterápicos com a decitabina.

Mutações no gene *EZH2* já foram citadas por conferir ganho de função ao gene (MORIN et al., 2010). Este gene codifica o componente catalítico da histona metiltransferase, a qual foi associada com perda de atividade em mutações associadas com malignidades mieloides (ERNST et al., 2010; STEGELMANN et al., 2010). A ativação da expressão do gene foi encontrada em pacientes com neoplasma mieloproliferativo (SKOV et al., 2010). Ainda, mutações que provocam a perda da função deste gene já foram citadas em LMA e pode bloquear a diferenciação mieloide (CAYE et al., 2015; ERNST et al., 2010; NIKOLOSKI et al., 2010; TANAKA et al., 2012). Ao contrário, mutações que provocam o ganho de função foram associadas a linfoma de células B (SNEERINGER et al., 2010; MORIN et al., 2010; YAP et al., 2011). Também, a baixa expressão do *EZH2* e do *KDM2B* já foram relacionadas com um perfil de doença mais agressiva (GENTLES et al., 2015; CANCER, 2013; CABRERO et al., 2016).

Gollner et al. (2017) observaram que a perda do *EZH2* induz resistência a múltiplas drogas em LMA, sugerindo que o restabelecimento da expressão de *EZH2* pode ser a chave para superar a resistência ao tratamento em pacientes com LMA. Porém, a alta expressão do *EZH2* em neoplasias malignas da linhagem mieloide também já foi associada com atividade oncogênica (LUND et al., 2014). Xu et al. (2011) investigaram a expressão de diferentes genes, incluindo o *EZH2*, e sua relação no tratamento com decitabina. Pacientes com SMD/LMA apresentaram uma expressão maior de *EZH2* comparados ao controle. Ainda, pacientes que receberam tratamento com decitabina apresentaram uma redução significativa de *EZH2*. Ainda, ressaltam que a expressão elevada de *EZH2* foi relacionada ao pior prognóstico.

Na contagem celular da linhagem K-562, os tratamentos da associação de decitabina com etoposídeo e vincristina em 48 horas, e doxorrubicina em 24 horas, apresentaram valores baixos em comparação com o tratamento isolado. Na expressão gênica, os mesmos tratamentos apresentaram uma baixa expressão de *EZH2*. Ainda, os tratamentos de citarabina e metotrexato associados à decitabina não apresentaram diferenças significativas em relação ao tratamento isolado na cultura celular e o mesmo foi observado na expressão gênica. Neste gene, para esta linhagem, não foi possível encontrar uma modificação na expressão precoce em relação à mudança de fenótipo, não sendo um candidato biomarcador precoce nestas condições. No entanto, sugere-se que o *EZH2* possa apresentar um potencial como

biomarcador de resposta ao tratamento e também alvo terapêutico, visto que Scott et al. (2016) demonstraram que inibidores de *EZH2* combinado com inibidores de Tirosina-cinase (TKI) resultaram numa diminuição significativa de células tronco leucêmicas.

Para o gene *EZH2*, na linhagem K-562, houve uma maior expressão no tratamento com decitabina isolada, sendo que a associação apresentou novamente um decréscimo de expressão de forma significativa, onde apenas para o tratamento com metotrexato não houve diminuição da expressão gênica. Neste caso, a decitabina pode estar atuando na sensibilização das células para o quimioterápico, permitindo uma maior morte celular como consequência (PAWLAK et al., 2016; SU et al., 2013; MIRZA et al., 2010).

Na linhagem RAJI, a expressão gênica do *EZH2* foi aumentada nos tratamentos com doxorrubicina e vincristina associados com decitabina, sendo que não houve diferença significativa na contagem de células. Houve diminuição da expressão gênica nos tratamentos com etoposídeo, citarabina e metotrexato associados com decitabina em comparação ao quimioterápico isolado. Apenas no tratamento com metotrexato houve diminuição significativa na contagem de células. Estes resultados estão de acordo com os apresentados e discutidos para a linhagem K-562, onde a diminuição do *EZH2* diminui significativamente a contagem de células como já observado por Scott et al. (2016) em células tronco leucêmicas. Diferentes estudos observaram que a inibição do *EZH2* é um importante alvo terapêutico para linfoma, já que este tem implicação na tumorigênese (SONG et al., 2016; BRADLEY et al., 2014; GUO et al., 2016). Assim, sugere-se que estudos sejam realizados em um período posterior às 48 horas avaliadas no presente estudo a fim de evidenciar uma possível queda na contagem de células para os tratamentos com diminuição significativa de *EZH2*, confirmando seu potencial como alvo terapêutico e biomarcador de acompanhamento e resposta ao tratamento.

A decitabina de forma isolada não apresentou, de forma geral, diferenças entre o grupo controle, demonstrando que o quimioterápico de forma isolada e/ou associado com a decitabina teve maior atividade na modulação da expressão gênica para o *EZH2* na linhagem RAJI.

O gene *IDH* é considerado um regulador epigenético e mutações nestes genes foram identificadas na LMA. Ainda, estas mutações geralmente estão associadas com mutações no gene *TET2* (GREEN, BEER, 2010; MARDIS et al., 2009; IM et al., 2014; CANCER, 2013). Mutações nos genes *IDH1/2* e *TET2*, geralmente com ganho de função, provocam uma diminuição no padrão de diferenciação de células da linhagem mieloide (FIGUEROA et al., 2010). Ainda sobre as mutações no gene *IDH*, estas podem demonstrar melhor resposta ao tratamento com decitabina em comparação com outras terapias (JIN et al., 2014). Em estudos em gliomas, foi observado que o tratamento com decitabina em células de glioma com *IDH1* mutante resultou em uma perda das propriedades estaminais e aumento de marcadores de diferenciação. Estes efeitos não foram observados em células de glioma com *IDH* do tipo selvagem tratadas com decitabina (TURCAN et al., 2013). Em pacientes com LLC, foi observada uma baixa expressão de *IDH2* e uma alta expressão de *IDH1* (VAN DAMME et al., 2016).

Referente a expressão do gene *IDH2* na linhagem K-562, nos tratamentos com doxorrubicina e citarabina associadas com decitabina houve uma diminuição da expressão gênica e não houve diferença significativa na contagem celular para o mesmo tratamento em comparação com o quimioterápico isolado após 48 horas. Nos tratamentos da associação de etoposídeo, vincristina e metotrexato com a decitabina houve aumento da expressão gênica em relação ao quimioterápico isolado, sendo observada uma diminuição significativa na contagem celular nos tratamentos com etoposídeo e vincristina. Sugere-se que uma avaliação por um período mais longo seja realizada a fim de evidenciar o comportamento celular no tratamento de associação entre decitabina e metotrexato, estabelecendo uma relação entre o aumento da expressão de *IDH2* e diminuição da contagem celular. Turcan et al. (2013) demonstraram que o *IDH1* mutado combinado ao tratamento com decitabina provocou a perda das propriedades estaminais das células e aumento de marcadores de diferenciação. Desta forma, possivelmente esta família de genes *IDH* pode ser alvo de acompanhamento na terapia, a fim de avaliar a resposta celular.

Para a linhagem RAJI, a expressão do gene *IDH2* foi significativamente elevada nos tratamentos com doxorrubicina e citarabina associados com decitabina, sendo que não houve diferença significativa na contagem de células em relação ao quimioterápico isolado. No tratamento com etoposídeo, vincristina e metotrexato

associados com decitabina houve uma diminuição da expressão gênica em relação ao quimioterápico isolado, sendo que apenas para o metotrexato foi possível observar diferença significativa na contagem de células. Um estudo clínico de fase I foi recentemente finalizado (NCT02273739) onde um inibidor de *IDH2* mutante foi utilizado para o tratamento de LMA, outras malignidades mieloides, tumores sólidos e gliomas. Mutações no gene *IDH2* levam a um ganho de função que provocam o bloqueio da diferenciação celular. Estas mutações já foram descritas também em linfoma de células T (STEIN et al., 2016; CAIRNS et al., 2013; CAIRNS et al., 2012). Com base nestes achados, uma baixa expressão do *IDH2* pode estar relacionada com a baixa contagem de células, como foi observado no tratamento com metotrexato. Porém, não existem dados na literatura sobre a relação entre este quimioterápico e a expressão de *IDH2*. Deve-se avaliar este comportamento após as 48 horas nos demais tratamentos que também apresentaram baixa na expressão gênica como etoposídeo e vincristina associados à decitabina.

De forma geral, a expressão gênica do *IDH2* na linhagem RAJI não foi modificada de forma significativa, apenas através do tratamento com decitabina, demonstrando-se significativamente elevada na associação com o quimioterápico ou com ele de forma isolada, evidenciando assim, a importância de estudos com associação de quimioterápicos a fim de observar seu comportamento em conjunto. Ainda, pode-se ressaltar que o quimioterápico apresentou capacidade de modular a expressão gênica.

A expressão gênica de *IDH2* na linhagem KASUMI-1 foi significativamente elevada na associação com doxorrubicina, etoposídeo, vincristina e metotrexato. Apenas no tratamento com citarabina houve uma diminuição significativa na expressão gênica em comparação com o quimioterápico isolado. Nenhum tratamento apresentou diferença significativa na contagem de células entre a associação e o quimioterápico isolado. Diversos casos de LMA apresentam mutações nos genes *IDH1* e *IDH2*. Stein (2015) observa que os resultados de estudos clínicos na inibição de *IDH2* mutante em pacientes com LMA são promissores. Porém, ressalta que esta inibição pode resultar em um tempo prolongado para uma resposta terapêutica. Ma et al., (2015) demonstraram que a alta expressão de *IDH1* é associada com pior prognóstico em LMA. Dados quanto à família de genes *IDH* são relacionados fortemente pela presença de mutação gênica e sua relação com a carcinogênese,

porém, como visto para o *IDH1* por Ma et al. pode-se observar que o comportamento da expressão gênica pode ser importante neste cenário. Desta forma, sugere-se que o aumento da expressão de *IDH2* pode apresentar um pior resultado prognóstico ao paciente como visto para o *IDH1*, já que não houve diferenças significativas na contagem de células. Lamba et al.(2015) demonstraram as alterações de expressão gênica induzida pela citarabina na LMA, sendo que não foram encontrados dados referente ao *IDH*. Isto demonstra que a citarabina, para esta linhagem, pode não atuar sobre a expressão do gene *IDH2* de forma significativa.

A expressão gênica do tratamento com decitabina em comparação ao controle foi significativamente menor e a associação de quimioterápico com decitabina apresentou aumento da expressão em todos os tratamentos em relação à decitabina. Isto demonstra que a decitabina de forma isolada não modulou a expressão gênica do *IDH2* nesta linhagem, sendo que esta atividade foi realizada significativamente pela associação do quimioterápico com a decitabina.

Mutações no *TET2* são frequentemente encontradas em SMD, a qual pode evoluir para LMA, LMMC e neoplasma mieloproliferativo. (ABDEL-WAHAB et al., 2009; SMITH et al., 2010). Ainda, mutações neste gene são relacionadas ao desenvolvimento de monocitose e leucocitose (JANKOWSKA et al., 2009; SMITH et al., 2010; TEFFERI et al., 2009a; TEFFERI et al., 2009b). A perda da função deste gene é considerada um fator importante para a transformação leucêmica, onde já foi observado *in vivo* que esta condição aumentou a renovação de células tronco hematopoiéticas, aumentou a proliferação de células mieloides, esplenomegalia e monocitose (MORAN-CRUSIO et al., 2011). A expressão de *TET2* é modulada durante a diferenciação eritroide (RUIZ et al., 2015).

A expressão do gene *TET2* para a linhagem K-562 apresentou um aumento nos tratamentos com doxorrubicina e etoposídeo associados com decitabina, os quais também demonstraram valores mais baixos na contagem de células no mesmo tratamento em 24 e 48 horas, respectivamente. O tratamento associado com vincristina apresentou diminuição da expressão gênica, confrontando com um baixo nível de contagem celular. Foi observado um aumento na expressão gênica do *TET2* no tratamento de metotrexato associado à decitabina e uma diminuição da expressão gênica para o tratamento associado com citarabina, sendo que nestes casos, não

houve diferença significativa na contagem de células em relação ao tratamento isolado. Pode-se observar que a decitabina, de forma geral, auxiliou na maior ativação do gene *TET2* como observado por Kuçuk et al. (2015) onde tratamento com decitabina em células NK reativou genes hipermetilados, entre eles o *TET2*, o qual foi avaliado por RT-qPCR. Este comportamento não pode ser observado na totalidade dos experimentos visto que podem estar ocorrendo limitações em relação à meia vida da decitabina e a sua relação ao quimioterápico associado (BOUMBER et al., 2011; COVEY et al., 1984; BROWN et al., 2004; GROS et al., 2012; MUND et al., 2005; VIJAYARAGHAVALU et al., 2013).

As modificações na expressão gênica de *TET2* na linhagem K-562 somente com decitabina em geral não demonstraram diferença significativa em relação ao controle sendo que somente em duas das cinco replicatas ocorreu diferença significativa (Figura 51 e 52), isto pode ser devido ao baixíssimo nível de expressão em todos os tratamentos utilizados dentro do mesmo experimento para o controle, decitabina isolada, quimioterápico isolado e associado na citarabina e metotrexato. Nos experimentos com vincristina e etoposídeo já houve um aumento do valor de expressão gênica na associação, e, principalmente no tratamento com doxorrubicina este valor foi mais elevado. Desta forma, possivelmente estas modificações da expressão gênica sejam em resposta diretamente ao quimioterápico utilizado. Portanto, mais análises podem ser realizadas com esta linhagem para estes quimioterápicos a fim de evidenciar o comportamento na cultura celular posterior à mudança na expressão gênica. De acordo com Sweeney et al. (2002) o tratamento com metotrexato exacerbou a progressão tumoral de LMC em camundongos. Isto pode estar relacionado com o fato da contagem de células não ter apresentado uma baixa significativa na contagem, pois neste caso o metotrexato pode não ser um quimioterápico adequado para esta patologia.

Para a linhagem RAJI, a expressão do gene *TET2* foi significativamente elevada em todos os tratamentos associados com decitabina, sendo que apenas no tratamento com metotrexato houve já uma modificação fenotípica, com diminuição significativa na contagem de células em relação ao quimioterápico isolado. Mutações com perda de função no *TET2* são muito frequentes em linfoma de células T bem como em malignidades mieloides (SAKATA-YANAGIMOTO et al., 2014; LEMONNIER et al., 2012; QUIVORON et al., 2011). Muto et al. (2014) demonstraram que a

diminuição da expressão de *TET2* em camundongos promoveu o desenvolvimento de linfoma de células T. Este gene é um regulador crítico da homeostase de células tronco hematopoiéticas e sua perda pode levar à malignidades hematológicas. Isto vai de encontro com os resultados encontrados, onde o grupo controle apresentou baixa expressão e, após o tratamento com quimioterápico associado à decitabina sua expressão apresentou um aumento. Desta forma, sugere-se que a expressão do gene *TET2* na linhagem RAJI tenha potencial como alvo terapêutico e biomarcador para acompanhamento sendo necessários mais estudos após o período de 48 horas avaliadas no presente estudo, para avaliar a modificação fenotípica das células comprovando assim seu mecanismo de ação nesta linhagem.

Ressalta-se que os níveis de expressão de *TET2* para a linhagem RAJI, apresentaram valores baixos no tratamento isolado com decitabina. Porém, os níveis de expressão foram significativamente elevados nas associações de quimioterápicos testadas, demonstrando novamente, um papel importante no comportamento da associação com a decitabina.

A função dos genes da família *KDM* não está completamente descrita, e podem ser considerados oncogenes ou supressores de tumor, sendo que o subtipo *KDM2B* já demonstrou papel pró e anti-oncogênico dependendo do contexto geral onde é encontrado (ROTILI, MAI, 2011; ANDRICOVICH et al., 2016). Este gene tem um papel importante na hematopoiese, sendo que em camundongos, sua perda provocou comprometimento de células-tronco hematopoiéticas e suas precursoras bem como a diferenciação linfóide (ANDRICOVICH et al., 2016). Também em camundongos que apresentavam alta expressão do gene, houve desenvolvimento de leucemia linfóide B ou mieloide (UEDA et al., 2015). *KDM2B* é um fator epigenético envolvido na leucemogênese e renovação de células-tronco, onde tem sua expressão elevada em resposta a sinais oncogênicos durante a leucemogênese (HE et al., 2011b). Porém, em células de medula de SMD, foi observada uma baixa expressão de *KDM2B* e *EZH2* quando comparadas aos controles (KAROOPONGSE et al., 2014).

Na linhagem K-562 houve uma baixa expressão do gene *KDM2B* nos tratamentos com doxorrubicina, citarabina e metotrexato associados à decitabina sem apresentar modificações significativas na contagem de células em relação ao quimioterápico isolado em 48 horas. Porém, no tratamento com doxorrubicina foi

possível observar uma diferença significativa na contagem de células após 24 horas de tratamento. Em 48 horas a associação se iguala ao quimioterápico isolado, podendo ser devido ao tempo de meia vida da decitabina. Diferentemente, o tratamento com etoposídeo apresentou uma expressão gênica significativamente maior em relação ao quimioterápico isolado com contagem celular significativamente baixa na associação. Em contraste, o tratamento com vincristina associada à decitabina apresentou baixa expressão gênica com uma menor contagem significativa de células. Assim, sugere-se que a baixa expressão do gene pode estar relacionada a uma diminuição nos sinais oncogênicos (HE et al., 2011b), diminuindo assim a contagem celular já evidenciada no tratamento da associação de doxorubicina e vincristina. Uma análise posterior às 48 horas pode ser realizada a fim de evidenciar este comportamento.

O tratamento com etoposídeo em associação com decitabina demonstrou comportamento inverso ao apresentado nos outros tratamentos, onde houve aumento da expressão gênica no tratamento em associação com diminuição da contagem celular em 48h. Não existem dados na literatura a respeito da relação entre os quimioterápicos utilizados no estudo com o gene *KDM2B*. Porém, ao comparar a contagem celular das associações para o etoposídeo e para a vincristina, pode-se observar uma diferença na capacidade de morte celular provocada por estes quimioterápicos para a linhagem K-562, podendo este fato, estar relacionado com a diferença no padrão de expressão encontrado.

Novamente, a expressão gênica de *KDM2B* na linhagem K-562 não foi elevada no tratamento isolado apenas com decitabina, sendo significativamente elevado apenas nos tratamentos com quimioterápico isolado e na associação de etoposídeo e decitabina, demonstrando assim que a ativação deste gene pode não estar associada ao papel desmetilante da decitabina, porém, esta pode estar auxiliando na sensibilização das células (PAWLAK et al., 2016; SU et al., 2013; MIRZA et al., 2010).

Para a linhagem RAJI, a expressão gênica apresentou aumento significativo para os tratamentos com etoposídeo, vincristina e citarabina associados com decitabina em relação ao quimioterápico isolado. Nestes tratamentos não houve diferenças significativas na contagem de células na associação em relação ao quimioterápico isolado, demonstrando uma modulação na expressão gênica antes de

mudança de fenótipo. Houve uma baixa expressão gênica nos tratamentos com doxorrubicina e metotrexato associados com decitabina, sendo que apenas para o metotrexato houve diferença significativa na contagem de células neste mesmo grupo comparativo. Malignidades hematopoiéticas apresentam maiores níveis de expressão do *KDM2B* comparada a outros tipos de cânceres epiteliais, principalmente em leucemias agudas e LNH (ANDRICOVICH et al., 2016). Esta informação vai de encontro com os resultados observados principalmente no tratamento com metotrexato, onde já foi possível observar que a diminuição da expressão do gene *KDM2B* houve diminuição na contagem celular. Não existe nenhuma relação na literatura para este gene e o metotrexato, sendo que mais estudos podem ser realizados a fim de comprovar sua relação. Contudo, já existem relatos entre o metotrexato e linfoma, onde Hira et al. (2015) utilizaram células RAJI e modelos *in vivo* e demonstraram que o tratamento com metotrexato auxiliou no prolongamento da sobrevida, diminuiu o crescimento tumoral, preveniu metástase e melhorou a resposta imune. Outros estudos também relacionam um efeito do tratamento com metotrexato em casos de linfoma, porém, ainda são contraditórios apresentando tanto resultados satisfatórios quanto insatisfatórios (FURUYA et al., 2014; LUO et al., 2016; KASENDA et al., 2012).

A decitabina apresentou baixa expressão gênica não sendo significativamente diferente do observado no grupo controle. Desta forma, os resultados sugerem que o quimioterápico isolado ou associado com a decitabina pode apresentar um poder na modulação da expressão diferentemente do encontrado apenas com a decitabina.

Para a linhagem KASUMI-1 a expressão gênica de *KDM2B* foi significativamente elevada nos tratamentos com doxorrubicina, etoposídeo e citarabina e significativamente baixa nos tratamentos com vincristina e metotrexato associados com decitabina em comparação ao quimioterápico isolado. Nenhum dos tratamentos apresentou diferença significativa na contagem de células na comparação da associação com o quimioterápico isolado. Não existem dados na literatura a respeito da modulação deste gene através destes quimioterápicos. Além disso, é pouco descrita sua função na patogênese da LMA. Porém, He et al. (2011) sugerem que o *KDM2B* atua como um oncogene apresentando um papel chave no desenvolvimento e manutenção da leucemia. Vale ressaltar que, como já comentado, apenas uma fração dos pacientes com LMA respondem a tratamentos com agentes

hipometilantes, como a decitabina e a azacitidina (YANG et al., 2010). Desta forma, para esta linhagem, sugere-se que os tratamentos com doxorrubicina, etoposídeo e citarabina associados com decitabina podem aumentar a atividade oncogênica de *KDM2B* e não apresentar resultados satisfatórios na morte celular. Já tratamentos com vincristina e metotrexato diminuiram a expressão do gene e podem ser avaliados em períodos posteriores a fim de evidenciar uma diminuição do papel oncogênico e consequente diminuição na contagem celular.

A expressão gênica do tratamento com decitabina em comparação ao controle foi significativamente elevada. O tratamento com o quimioterápico isolado apresentou expressão significativamente baixa em relação à decitabina, com exceção do metotrexato, que foi significativamente elevado em relação à decitabina. Isto demonstra a capacidade de modulação deste gene nesta linhagem por estes fármacos. Porém, como já citado por Andricovich et al. (2016) a LMA apresenta maiores níveis de expressão do *KDM2B*.

Foi observado que os tratamentos utilizados podem modular a expressão dos genes estudados, e ainda, esta modulação pode ser detectada antes de uma mudança fenotípica. Os resultados ampliam as possibilidades para estes genes como potenciais biomarcadores no acompanhamento e resposta ao tratamento, bem como potenciais alvos terapêuticos.

Com base na atividade descrita de cada um dos genes estudados e com base nos estudos já realizados, sugere-se que um aumento da expressão de *EZH2*, *IDH2* e *KDM2B*, além de uma diminuição da expressão de *TET2*, pode resultar em um pior prognóstico ao paciente 9 (Tabela 7, 8 e 9).



KASUMI-1	DOXO	VP-16	VCR	ARA-C	MTX
<i>IDH2</i> ↑ 	↑	↑	↑	↓	↑
<i>KDM2B</i> ↑ 	↑	↑	↓	↑	↓

Tabela 7: Resultados encontrados na expressão gênica dos genes *EZH2*, *IDH2*, *KDM2B* e *TET2* na linhagem KASUMI-1, na associação de decitabina com cada um dos quimioterápicos descritos





K-562	DOXO	VP-16	VCR	ARA-C	MTX
<i>EZH2</i> ↑ 	↓	↓	↓	≠	≠
<i>IDH2</i> ↑ 	↓	↑	↑	↓	↑
<i>KDM2B</i> ↑ 	↓	↑	↓	↓	↓
<i>TET2</i> ↓ 	↑	↑	↓	↓	↑

Tabela 8: Resultados encontrados na expressão gênica dos genes *EZH2*, *IDH2*, *KDM2B* e *TET2* na linhagem K-562, na associação de decitabina com cada um dos quimioterápicos descritos





RAJI	DOXO	VP-16	VCR	ARA-C	MTX
<i>EZH2</i> ↑ 	↑	↓	↑	↓	↓
<i>IDH2</i> ↑ 	↑	↓	↓	↑	↓
<i>KDM2B</i> ↑ 	↓	↑	↑	↑	↓
<i>TET2</i> ↓ 	↑	↑	↑	↑	↑

Tabela 9: Resultados encontrados na expressão gênica dos genes *EZH2*, *IDH2*, *KDM2B* e *TET2* na linhagem RAJI, na associação de decitabina com cada um dos quimioterápicos descritos.

6. CONCLUSÃO

Apesar da ampla variedade de drogas utilizadas atualmente para o tratamento de diversos tipos de câncer e do amplo número de estudos clínicos e experimentais, ainda sabe-se pouco a respeito do modo de ação destes quimioterápicos, seu comportamento nos diferentes tipos de câncer ou linhagem celular e também seu comportamento quando associado a outras drogas. Cada vez mais, novos estudos demonstram a relação entre a carcinogênese e eventos epigenéticos, sustentando a importância de tratamentos com agentes hipometilantes, como a decitabina. Desta forma, torna-se importante a investigação do comportamento de diferentes drogas associadas a agentes hipometilantes em diferentes linhagens a fim de estabelecer melhor a atuação e relação das mesmas.

Este estudo pode demonstrar que a decitabina pode sensibilizar as células da linhagem K-562 tratada com os quimioterápicos etoposídeo e vincristina e linhagem RAJI tratada com metotrexato. Este comportamento não foi observado na linhagem KASUMI-1, possivelmente sendo relacionado à baixa taxa de resposta para agentes hipometilantes encontrada para pacientes com LMA.

Também, o gene *EZH2* apresentou um comportamento fortemente associado ao encontrado na contagem de células na linhagem K-562, e sugere-se uma investigação mais aprofundada do gene como possível biomarcador de resposta ao tratamento. Na linhagem RAJI, o gene *TET2* demonstrou um comportamento semelhante, aumentando significativamente sua expressão após o tratamento. Dada sua relação com o desenvolvimento de linfomas, sugere-se sua investigação de forma mais aprofundada. Ainda, para a linhagem K-562 os resultados para o gene *IDH2*

demonstraram comportamento possivelmente associado à biomarcador de resposta, podendo ser mais estudado para esta finalidade.

Conclui-se que foi possível modular a expressão gênica *in vitro* mediante os tratamentos utilizados e na sua associação com decitabina. E ainda, esta modulação apresentou-se, por vezes, precoce à mudança de fenótipo, o que pode ser importante na investigação de novos biomarcadores. Mais estudos devem ser realizados para verificar o comportamento celular após as modificações observadas na expressão gênica a fim de observar se o comportamento da expressão gênica em quimioterápicos, e já com modificação na contagem de células, pode ser evidenciado também nos tratamentos apenas com modificação gênica. Acredita-se que esta diferença na modificação da expressão gênica anterior à contagem de células pode apresentar-se em períodos diferentes de acordo com o quimioterápico, devido ao seu mecanismo de ação bem como seu tempo de meia-vida, podendo assim, provocar as alterações em períodos diferentes às 48 horas testadas no presente estudo.

REFERÊNCIAS

ABDEL-WAHAB, Omar et al. Genetic characterization of TET1, TET2, and TET3 alterations in myeloid malignancies. **Blood**, v. 114, n. 1, p. 144-147, 2009.

ANDRICOVICH, Jaclyn et al. Histone demethylase *KDM2B* regulates lineage commitment in normal and malignant hematopoiesis. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 126, n. 3, p. 905-920, mar. 2016

ANSELL, Stephen M. Non-Hodgkin Lymphoma: Diagnosis and Treatment. **Mayo Foundation for Medical Education and Research**, n. 90, v. 8, p. 1152-1163, 2015

ANVISA. TEVAETOPO® (etoposídeo). Disponível em:
http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=10568192015&pIdAnexo=2980653 Acesso em 8 jan. 2017

BACHER, Ulrike; SCHNITTGER, Susanne; HAFERLACH, Torsten. Molecular genetics in acute myeloid leukemia. **Wolters Kluwer Health**, n. 22, p. 646-655, 2010

BEJAR, Rafael et al., Clinical Effect of Point Mutations in Myelodysplastic Syndromes. **The New England journal of medicine**, n. 364, p. 2496-2506, 2011

BENTON, Christopher B. et al. Safety and clinical activity of 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine) with or without Hyper-CVAD in relapsed/refractory acute lymphocytic leukaemia. **British journal of haematology**, v. 167, n. 3, p. 356-365, 2014.

BRADLEY, William D. et al. EZH2 inhibitor efficacy in non-Hodgkin's lymphoma does not require suppression of H3K27 monomethylation. **Chemistry & biology**, v. 21, n. 11, p. 1463-1475, 2014.

BROWN, Robert; PLUMB, Jane A. Demethylation of DNA by decitabine in cancer chemotherapy. **Expert review of anticancer therapy**, v. 4, n. 4, p. 501-510, 2004.

BROXTERMAN, Henk J.; GOTINK, Kristy J.; VERHEUL, Henk MW. Understanding the causes of multidrug resistance in cancer: a comparison of doxorubicin and sunitinib. **Drug Resistance Updates**, v. 12, n. 4, p. 114-126, 2009..

CABRERO, Monica et al. Down-regulation of *EZH2* expression in myelodysplastic syndromes. **Leukemia research**, v. 44, p. 1-7, 2016.

CAIRNS, Rob A. et al. IDH2 mutations are frequent in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. **Blood**, v. 119, n. 8, p. 1901-1903, 2012.

CAIRNS, Rob A.; MAK, Tak W. Oncogenic isocitrate dehydrogenase mutations: mechanisms, models, and clinical opportunities. **Cancer discovery**, v. 3, n. 7, p. 730-741, 2013.

CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK et al. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. **N Engl J Med**, v. 2013, n. 368, p. 2059-2074, 2013.

CASTAIGNE, Sylvie et al. Effect of gemtuzumab ozogamicin on survival of adult patients with de-novo acute myeloid leukaemia (ALFA-0701): a randomised, open-label, phase 3 study. **The Lancet**, v. 379, p. 1508-1516, abr. 2012

CAYE, Aurélie et al. Juvenile myelomonocytic leukemia displays mutations in components of the RAS pathway and the PRC2 network. **Nature genetics**, 2015.

CHAKRABORTY, Chiranjib et al. MicroRNAs mediated regulation of MAPK signaling pathways in chronic myeloid leukemia. **Oncotarget**, p. 1-15, mar. 2016

COVEY, J. M.; ZAHARKO, D. S. Effects of dose and duration of exposure on 5-aza-2'-deoxycytidine cytotoxicity for L1210 leukemia *in vitro*. **Cancer treatment reports**, v. 68, n. 12, p. 1475-1481, 1984.

DORANTES-ACOSTA, Elisa; PELAYO, Rosana. Lineage Switching in Acute Leukemias: A Consequence of Stem Cell Plasticity? **Bone Marrow Research**, v. 18, p. 1-18, 2012

EMOLE, Josephine; TALABI, Taiwo; PINILLA-IBARZ, Javier. Update on the management of Philadelphia chromosome positive chronic myelogenous leukemia: role of nilotinib. **Biologics: Targets and Therapy**, v. 10, p. 23-31, fev. 2016

EPPERT, Kolja et al. Stem cell gene expression programs influence clinical outcome in human leukemia. **Nature Medicine**, v. 17, n. 9, p. 1086-1094, 2011

ERNST, Thomas et al. Inactivating mutations of the histone methyltransferase gene *EZH2* in myeloid disorders. **Nature genetics**, v. 42, n. 8, p. 722-726, 2010.

EYÜPOĞLU, Damla et al. The Impact of Variant Philadelphia Chromosome Translocations on the Clinical Course of Chronic Myeloid Leukemia. **Turkish Journal of Hematology**, v. 33, p. 60-65, mar. 2016

FAN, Hui et al. Low-dose decitabine-based chemoimmunotherapy for patients with refractory advanced solid tumors: a phase I/II report. **Journal of immunology research**, v. 2014, 2014

FERREL, Paul Brent et al. High-Dimensional Analysis of Acute Myeloid Leukemia Reveals Phenotypic Changes in Persistent Cells during Induction Therapy. **Plos One**, v. 11, n. 4, p. 1-17, abr. 2016

FIGUEROA, Maria E. et al. Leukemic *IDH1* and *IDH2* mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt *TET2* function, and impair hematopoietic differentiation. **Cancer cell**, v. 18, n. 6, p. 553-567, 2010.

FLEURY, I. et al. Rituximab and risk of second primary malignancies in patients with non-Hodgkin lymphoma: a systematic review and meta-analysis. **Annals of Oncology**, n. 27, p. 390–397, dez. 2015

FURUYA, Kazuhide et al. High-dose methotrexate monotherapy followed by radiation for CD30-positive, anaplastic lymphoma kinase-1–positive anaplastic large-cell lymphoma in the brain of a child: Case report. **Journal of Neurosurgery: Pediatrics**, v. 14, n. 3, p. 311-315, 2014.

GAHLAUT, Renu et al. Effect of neoadjuvant chemotherapy on breast cancer phenotype, ER/PR and HER2 expression e Implications for the practising oncologist. **European Journal of Cancer**, v. 60, p. 40-48, 2016

GAO, Su et al. Decitabine in the treatment of acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes, which combined with complex karyotype respectively. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 16, n. 15, p. 6627-6632, 2015.

GENG, Suxia et al. Effects of the combination of decitabine and homoharringtonine in SKM-1 and Kg-1a cells. **Leukemia research**, v. 44, p. 17-24, 2016.

GENTLES, Andrew J. et al. The prognostic landscape of genes and infiltrating immune cells across human cancers. **Nature medicine**, v. 21, n. 8, p. 938-945, 2015.

GÖLLNER, Stefanie et al. Loss of the histone methyltransferase EZH2 induces resistance to multiple drugs in acute myeloid leukemia. **Nature Medicine**, 2016.

GREEN, Anthony; BEER, Philip. Somatic mutations of *IDH1* and *IDH2* in the leukemic transformation of myeloproliferative neoplasms. **New England Journal of Medicine**, v. 362, n. 4, p. 369-370, 2010.

GROS, Christina et al. DNA methylation inhibitors in cancer: recent and future approaches. **Biochimie**, v. 94, n. 11, p. 2280-2296, 2012.

GROVER, Natalie S.; PARK, Steven I. Novel Targeted Agents in Hodgkin and Non-Hodgkin Lymphoma Therapy. **Pharmaceuticals**, v. 8, p. 607-636, set. 2015
HAFERLACH, T. et al. Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes. **Leukemia**, n. 28, p. 241–247, 2014

GUO, Shuangping et al. Clinicopathological features of primary diffuse large B-cell lymphoma of the central nervous system—strong EZH2 expression implying diagnostic and therapeutic implication. **APMIS**, v. 124, n. 12, p. 1054-1062, 2016.

HARRIS, Nancy Lee, et al. A Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms: A Proposal from the International Lymphoma Study Group. **Blood Journal**, v. 84, n. 5, p. 1361-1392, set. 1994

HASSERJIAN, R. P. Acute myeloid leukemia: advances in diagnosis and classification. **International Journal of Laboratory Hematology**, v. 35, p. 358-366, 2013

HE, Jin; NGUYEN, Anh Tram; ZHANG, Yi. *KDM2b/JHDM1b*, an H3K36me2-specific demethylase, is required for initiation and maintenance of acute myeloid leukemia. **Blood**, v. 117, n. 14, p. 3869-3880, 2011b.

HIRA, Sumit Kumar et al. Methotrexate-Loaded Four-Arm Star Amphiphilic Block Copolymer Elicits CD8+ T Cell Response against a Highly Aggressive and Metastatic Experimental Lymphoma. **ACS applied materials & interfaces**, v. 7, n. 36, p. 20021-20033, 2015.

HOFFBRAND, A. V.; MOSS, P.A.H.; PETTIT, J. E. **Fundamentos em hematologia**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, p. 167-184, 2006

IM, A. P. et al. DNMT3A and IDH mutations in acute myeloid leukemia and other myeloid malignancies: associations with prognosis and potential treatment strategies. **Leukemia**, v. 28, n. 9, p. 1774-1783, 2014.

INCA. **Atlas On-line de Mortalidade**. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 2015. Disponível em < <https://mortalidade.inca.gov.br/MortalidadeWeb/>> Acesso em 26 abr. 2016

INCA. **Estimativa 2016**: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 2015. Disponível em < http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/tbregioes_consolidado.asp> Acesso em 26 abr. 2016

INCA. **Situação do câncer no Brasil**: tratamento do Câncer no SUS. p. 94-99. Disponível em < <http://www.inca.gov.br/situacao/>>. Acesso em 26 abr. 2016

INCA. **Tipos de câncer: Leucemia**. Disponível em < <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/leucemia/definicao>>. Acesso em 03 maio 2016

ISSA, Jean-Pierre J. DNA methylation as a therapeutic target in cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 13, n. 6, p. 1634-1637, 2007.

ISSA, Jean-Pierre J. Epigenetics in cancer: what's the future? **Oncology**, v. 25, n. 3, p. 220, 2011.

ISSA, Jean-Pierre J. et al. Phase 1 study of low-dose prolonged exposure schedules of the hypomethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine) in hematopoietic malignancies. **Blood**, v. 103, n. 5, p. 1635-1640, 2004.

JABBOUR, Elias. Chronic myeloid leukemia: First-line drug of choice. **American Journal of Hematology**, v. 91, n. 1, jan. 2016

JAIN, Ankur; GUPTA, Naresh. Isolated CNS Blast Crises in Chronic Myeloid Leukaemia Presenting as Hypertrophic Pachymeningitis and Bilateral Optic Neuritis: A Case Report. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 10, n. 1, p. 1-5, Jan. 2016

JANCZAR, Szymon et al. The Role of Histone Protein Modifications and Mutations in Histone Modifiers in Pediatric B-Cell Progenitor Acute Lymphoblastic Leukemia. **Cancers**, v. 9, n. 1, p. 2, 2017

JANKOWSKA, Anna M. et al. Loss of heterozygosity 4q24 and *TET2* mutations associated with myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. **Blood**, v. 113, n. 25, p. 6403-6410, 2009.

JIANG, Xuejie et al. The hypomethylating agent decitabine prior to chemotherapy improves the therapy efficacy in refractory/relapsed acute myeloid leukemia patients. **Blood**, v. 126, n. 23, p. 4932-4932, 2015.

JIN, Jie et al. Prognostic value of isocitrate dehydrogenase mutations in myelodysplastic syndromes: a retrospective cohort study and meta-analysis. **PloS one**, v. 9, n. 6, p. e100206, 2014.

JOECKEL, Tina E.; LÜBBERT, Michael. Clinical results with the DNA hypomethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine) in patients with myelodysplastic syndromes: an update. **Seminars in Hematology**. n. 4, v. 49, p. 330–341, 2012

KANTARJIAN, Hagop et al. Decitabine improves patient outcomes in myelodysplastic syndromes. **Cancer**, v. 106, n. 8, p. 1794-1803, 2006.

KANTARJIAN, Hagop et al. Results of a randomized study of 3 schedules of low-dose decitabine in higher-risk myelodysplastic syndrome and chronic myelomonocytic leukemia. **Blood**, v. 109, n. 1, p. 52-57, 2007.

KASENDA, Benjamin et al. The prognostic value of serum methotrexate area under curve in elderly primary CNS lymphoma patients. **Annals of hematology**, v. 91, n. 8, p. 1257-1264, 2012.

KHAJAPEER, Kalubai Vari; BASKARAN, Rajasekaran. Hsp90 Inhibitors for the Treatment of Chronic Myeloid Leukemia. **Leukemia Research and Treatment**, v. 2015, p. 1-16, 2015

KHALED, Samer; MALKI, Monzr Al.; MARCUCCI, Guido. Acute Myeloid Leukemia: Biologic, Prognostic, and Therapeutic Insights. **Oncology Journal, Hematologic Malignancies, Leukemia & Lymphoma**, v. 30, n. 4, p. 318-329, abr. 2016

KHWAJA, Asim et al. Acute myeloid leukaemia. **Nature Reviews: Disease Primers**. v. 2, p. 1-22, mar. 2016

KOPP, Lisa M. et al. Decitabine has a biphasic effect on natural killer cell viability, phenotype, and function under proliferative conditions. **Molecular immunology**, v. 54, n. 3, p. 296-301, 2013

KOTHARI, Anisha; HITTELMAN, Walter N.; CHAMBERS, Timothy C. Cell Cycle–Dependent Mechanisms Underlie Vincristine-Induced Death of Primary Acute Lymphoblastic Leukemia Cells. **Cancer research**, v. 76, n. 12, p. 3553-3561, 2016

KRISTENSEN, Lasse Sommer et al. Aberrant methylation of cell-free circulating DNA in plasma predicts poor outcome in diffuse large B cell lymphoma. **Clinical Epigenetics**, v. 8, n. 1, p. 95, 2016

KÜÇÜK, Can et al. Global promoter methylation analysis reveals novel candidate tumor suppressor genes in natural killer cell lymphoma. **Clinical Cancer Research**, v. 21, n. 7, p. 1699-1711, 2015.

LAMBA, Jatinder K. et al. Clinical significance of in vivo cytarabine-induced gene expression signature in AML. **Leukemia & Lymphoma**, v. 57, n. 4, p. 909-920, 2016.

LARSON, Richard A. Cytogenetics, Not Just Previous Therapy, Determines the Course of Therapy-Related Myeloid Neoplasms. **Journal of Clinical Oncology**, v. 30, n.19, p. 380-385, jul. 2012

LEE, Sang Min et al. Bcr-Abl-independent imatinib-resistant K-562 cells show aberrant protein acetylation and increased sensitivity to histone deacetylase inhibitors. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 322, n. 3, p. 1084-1092, 2007

LEMONNIER, François et al. Recurrent TET2 mutations in peripheral T-cell lymphomas correlate with TFH-like features and adverse clinical parameters. **Blood**, v. 120, n. 7, p. 1466-1469, 2012.

LERMA-DÍAZ, José Manuel et al. *In vivo* and *in vitro* sensitization of leukemic cells to adriamycin-induced apoptosis by pentoxifylline: Involvement of caspase cascades and IκBα phosphorylation. **Immunology letters**, v. 103, n. 2, p. 149-158, 2006.

LI, Kongfei et al. Sequential combination of decitabine and idarubicin synergistically

enhances anti-leukemia effect followed by demethylating Wnt pathway inhibitor promoters and downregulating Wnt pathway nuclear target. **Journal of translational medicine**, v. 12, n. 1, p. 167, 2014.

LIN, Pei-Jung et al. Linking Costs and Survival in the Treatment of Older Adults with Chronic Myeloid Leukemia: An Analysis of SEER-Medicare Data from 1995 to 2007. **Medical Care**, v. 54, n. 4, p. 380-385, abr. 2016

LIN, Tung-Liang et al. Clonal leukemic evolution in myelodysplastic syndromes with *TET2* and *IDH1/2* mutations. **Haematologica**, n. 99, v. 1, p. 28-36, 2014

LORENZI, Therezinha F. et al. **Manual de hematologia**: propedêutica e clínica. 3. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., p. 6-7; 297-307, 2003

LÖWENBERG, Bob. Sense and nonsense of high-dose cytarabine for acute myeloid leukemia. **Blood**, v. 121, n. 1, p. 26-28, 2013.

LÜBBERT, Michael et al. Low-dose decitabine versus best supportive care in elderly patients with intermediate-or high-risk myelodysplastic syndrome (MDS) ineligible for intensive chemotherapy: final results of the randomized phase III study of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer Leukemia Group and the German MDS Study Group. **Journal of Clinical Oncology**, v. 29, n. 15, p. 1987-1996, 2011.

LUND, K.; ADAMS, P. D.; COPLAND, M. EZH2 in normal and malignant hematopoiesis. **Leukemia**, v. 28, n. 1, p. 44-49, 2014.

LUO, W. et al. Clinical Therapeutic Efficacy of Rituximab Combined with Methotrexate on Primary Central Nervous System Lymphoma. **Zhongguo shi yan xue ye xue za zhi/Zhongguo bing li sheng li xue hui= Journal of experimental hematology/Chinese Association of Pathophysiology**, v. 24, n. 2, p. 444-447, 2016.

MA, Qiu-Ling et al. High IDH1 expression is associated with a poor prognosis in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. **Blood**, v. 124, n. 21, p. 5314-5314, 2014.

MAESHIMA, Akiko M. et al. Follow-up Data of 10 Patients With B-cell Non-Hodgkin Lymphoma With a CD20-negative Phenotypic Change After Rituximab-containing Therapy. **The American Journal Surgical Pathology**, v. 37, n. 4, p. 563-570, abr. 2013

MALTA, Júlia Dias Santana; SCHALL, Virgínia Torre; MODENA, Celina Maria. O momento do diagnóstico e as dificuldades encontradas pelos oncologistas pediátricos no tratamento do câncer em Belo Horizonte. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 55, n.1, p. 33-39, 2009

MARCUCCI, Guido; HAERLACH, Torsten; DÖHNER, Hartmut. Molecular Genetics of Adult Acute Myeloid Leukemia: Prognostic and Therapeutic Implications. **Journal of Clinical Oncology**, v. 9, n. 5, p. 475-487, 2011

MARDIS, Elaine R. et al. Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. **New England Journal of Medicine**, v. 361, n. 11, p. 1058-1066, 2009.

MASCARENHAS, John et al. Epigenetic abnormalities in myeloproliferative neoplasms: a target for novel therapeutic strategies. **Clinical epigenetics**, v. 2, n. 2, p. 197, 2011.

MENDONÇA, Paulo Eduardo Xavier de. **Debater sobre Oncologia – SUS, ideias e soluções**. Câmara dos deputados comissão de seguridade social e família. 2015

MINISTÉRIO DA SAÚDE: Coordenação geral de atenção as pessoas com doenças crônicas, Departamento de atenção especializada e temática. Secretaria de atenção à saúde. **Audiência Pública do Senado**. Brasília, Dez. 2014

MINISTÉRIO DA SAÚDE: Secretaria de atenção à saúde (SAS), Departamento de assistência especializada (DAE), Coordenação geral de alta e média complexidade: Maria Inez Pordeuz Gadelha. **Política Nacional do Câncer Feminino**. Rio de Janeiro, jun. 2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Sistema de informações sobre mortalidade (SIM)**. Brasília, 2013. Disponível em: < <http://datasus.saude.gov.br/>> Acesso em 26 abr. 2016.

MIRZA, Sameer et al. Demethylating agent 5-aza-2-deoxycytidine enhances susceptibility of breast cancer cells to anticancer agents. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 342, n. 1-2, p. 101-109, 2010.

MOON, Ji Wook et al. Demethylation of RUNX3 by vincristine in colorectal adenocarcinoma cells. **Anticancer research**, v. 34, n. 1, p. 133-140, 2014.

MORAN-CRUSIO, Kelly et al. Tet2 loss leads to increased hematopoietic stem cell self-renewal and myeloid transformation. **Cancer cell**, v. 20, n. 1, p. 11-24, 2011.

MORIN, Ryan D. et al. Somatic mutations altering *EZH2* (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin. **Nature genetics**, v. 42, n. 2, p. 181-185, 2010.

MUGHAL, Tariq et al. Chronic myeloid leukemia: reminiscences and dreams. **Haematologica**, v. 101, n. 5, p. 541-558, 2016

MUND, Cora et al. Characterization of DNA demethylation effects induced by 5-Aza-2'-deoxycytidine in patients with myelodysplastic syndrome. **Cancer Research**, v. 65, n. 16, p. 7086-7090, 2005.

MUTO, Hideharu et al. Reduced TET2 function leads to T-cell lymphoma with follicular helper T-cell-like features in mice. **Blood cancer journal**, v. 4, n. 12, p. e264, 2014.

NCCN - National Comprehensive Cancer Network. Diretrizes de práticas Clínicas em Oncologia da NCCN. Versão 3.2016.

NIETO, Maria et al. The European Medicines Agency Review of Decitabine (Dacogen) for the Treatment of Adult Patients with Acute Myeloid Leukemia: Summary of the Scientific Assessment of the Committee for Medicinal Products for Human Use. **The Oncologist**, v. 21, p. 1-9. 2016

NIKOLOSKI, Gorica et al. Somatic mutations of the histone methyltransferase gene *EZH2* in myelodysplastic syndromes. **Nature genetics**, v. 42, n. 8, p. 665-667, 2010.

NYCE, Jonathan. Drug-induced DNA hypermethylation and drug resistance in human tumors. **Cancer research**, v. 49, n. 21, p. 5829-5836, 1989

OAKES, Christopher C. et al. DNA methylation dynamics during B cell maturation underlie a continuum of disease phenotypes in chronic lymphocytic leukemia. **Nature Genetics**, p. 1-15, jan. 2016

OWEN, Helen C. et al. Low Frequency of Epigenetic Events in Urothelial Tumors in Young Patients. **The Journal of Urology**, v. 184, p. 459-463, 2010

PALLIS, Athanasios G et al. Evaluating the physiological reserves of older patients with cancer: The value of potential biomarkers of aging? **Journal of Geriatriconcology**, p. 204-218, 2014

PARK, Juyoung et al. Comparison of 2-methoxyestradiol and methotrexate effects on non-Hodgkin's B-cell lymphoma. **Current eye research**, v. 32, n. 7-8, p. 659-667, 2007

PAWLAK, Alicja et al. Long-lasting reduction in clonogenic potential of colorectal cancer cells by sequential treatments with 5-azanucleosides and topoisomerase inhibitors. **BMC cancer**, v. 16, n. 1, p. 893, 2016.

PEEDICAYIL, Jacob. The role of DNA methylation in the pathogenesis and treatment of cancer. **Current clinical pharmacology**, v. 7, n. 4, p. 333-340, 2012.

PETTIT, Kristen; ODENIKE, Olatoyosi. Defining and Treating Older Adults with Acute Myeloid Leukemia who Are ineligible for intensive Therapies. **Frontiers in Oncology**, v. 5, p. 1-9, 2015

QUIVORON, Cyril et al. TET2 inactivation results in pleiotropic hematopoietic abnormalities in mouse and is a recurrent event during human lymphomagenesis. **Cancer cell**, v. 20, n. 1, p. 25-38, 2011.

RAPAPORT, Samuel I. **Hematologia**: introdução. 2. ed. São Paulo: Editora Roca, p.176-177, 1990

RECH, Angela. **Influência da punção lombar traumática e da quimioterapia intratecal na sobrevida de pacientes pediátricos com leucemia linfocítica aguda**. Porto Alegre, RS, 2005

RENZI, Chiara et al. The choice dilemma in chronic hematological conditions: Why choosing is not only a medical issue? A psycho-cognitive perspective. **Oncology/Hematology**, n. 99, p. 134-140, 2016

ROSSI, D. et al. Molecular prediction of durable remission after first-line fludarabine cyclophosphamide-rituximab in chronic lymphocytic leukemia. **Blood Journal**, v. 126, n. 16, p. 1921-1924, out. 2015

ROTILI, Dante; MAI, Antonello. Targeting histone demethylases a new avenue for the fight against cancer. **Genes & cancer**, v. 2, n. 6, p. 663-679, 2011.

RUIZ, Maria Armila et al. Hydroxymethylcytosine and demethylation of the γ -globin gene promoter during erythroid differentiation. **Epigenetics**, v. 10, n. 5, p. 397-407, 2015.

SAKATA-YANAGIMOTO, Mamiko et al. Somatic RHOA mutation in angioimmunoblastic T cell lymphoma. **Nature genetics**, v. 46, n. 2, p. 171-175, 2014.

SANTINI, Valeria; KANTARJIAN, Hagop M.; ISSA, Jean-Pierre. Changes in DNA methylation in neoplasia: pathophysiology and therapeutic implications. **Annals of internal medicine**, v. 134, n. 7, p. 573-586, 2001.

SANTOS, Aline Xavier da Silveira dos. **Gangliosídeos e a modulação da proliferação mediada pelo fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF)**. Porto Alegre, 2009

SANZ, Miguel A. et al. Emerging strategies for the treatment of older patients with acute myeloid leukemia. **Annals of Hematology**, p.1-11, abr 2016

SARRIS, Andreas H. et al. Trimetrexate in relapsed T-cell lymphoma with skin involvement. **Journal of clinical oncology**, v. 20, n. 12, p. 2876-2880, 2002

SAUBELLE, Susanne et al. The concept of treatment-free remission in chronic myeloid leukemia. **Leukemia**, p.1-48, maio 2016

SCOTT, Mary T. et al. Epigenetic reprogramming sensitizes CML stem cells to combined EZH2 and tyrosine kinase inhibition. **Cancer discovery**, v. 6, n. 11, p. 1248-1257, 2016.

SEYFIZADEHA, Narges et al. A molecular perspective on rituximab: A monoclonal antibody for B cell non Hodgkin lymphoma and other affections. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, n. 97, p. 275–290, set. 2015

SHEN, Yang et al. Gene mutation patterns and their prognostic impact in a cohort of 1185 patients with acute myeloid leukemia. **Blood Journal**, v. 118, n. 20, p. 5593-5603, 2011

SKOV, Vibe et al. Enhanced gene expression of EZH2 in patients with primary myelofibrosis. **Blood**, v. 116, n. 21, p. 4118-4118, 2010.

SMITH, Alexander E. et al. Next-generation sequencing of the *TET2* gene in 355 MDS and CMML patients reveals low-abundance mutant clones with early origins, but indicates no definite prognostic value. **Blood**, v. 116, n. 19, p. 3923-3932, 2010.

SNEERINGER, Christopher J. et al. Coordinated activities of wild-type plus mutant *EZH2* drive tumor-associated hypertrimethylation of lysine 27 on histone H3 (H3K27)

in human B-cell lymphomas. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 49, p. 20980-20985, 2010.

SNOWDEN, Alicia et al. Prevention and management of obinutuzumab-associated toxicities: Australian experience. **International Journal of Nursing Practice**, v. 21, p. 15-27, 2015

SOCIEDADE BRASILEIRA DE ONCOLOGIA. **Linfomas**. Disponível em <
http://www.sbcancer.org.br/home2/site/index.php?option=com_content&view=article&id=120:linfomas&catid=29&Itemid=123> Acesso em 19 maio 2016

SOLIMINI, Angelo G. et al., Meat intake and non-Hodgkin lymphoma: a meta-analysis of observational studies. **Cancer Causes Control**, n. 27, p. 595-606, abr. 2016

SONG, Xuejiao et al. Selective inhibition of EZH2 by ZLD10A blocks H3K27 methylation and kills mutant lymphoma cells proliferation. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 81, p. 288-294, 2016.

SOVERINI, Simona et al. Mutations in the BCR-ABL1 Kinase Domain and Elsewhere in Chronic Myeloid Leukemia. **Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia**, v.15, n. 1, p.120-128, jun. 2015

SQUILLACI, E. et al. Real-time ultrasound elastography for assessment of response to brentuximab vedotin treatment in relapsed and refractory Hodgkin lymphoma. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, n. 20, p. 1628-1635, 2016

STEGELMANN, Frank et al. Mutations of EZH2 in myeloproliferative neoplasms with myelofibrosis: correlation with molecular and clinical data. **Blood**, v. 116, n. 21, p. 4111-4111, 2010.

STEIN, Eytan M. IDH2 inhibition in AML: Finally progress? **Best practice & research Clinical haematology**, v. 28, n. 2, p. 112-115, 2015.

STEIN, E.M. Molecular pathways: *IDH2* mutations co-opting cellular metabolism for malignant transformation. **Clinical Cancer Research**, n. 22, v. 1, p. 16-9, 2016

SU, Xianwei et al. Lipid–Polymer Nanoparticles Encapsulating Doxorubicin and 2'-Deoxy-5-azacytidine Enhance the Sensitivity of Cancer Cells to Chemical

Therapeutics. **Molecular pharmaceutics**, v. 10, n. 5, p. 1901-1909, 2013.

SULLIVAN, Con et al. Targeted therapy of chronic myeloid leukemia. **Biochemical Pharmacology**, v. 80, p. 584-591, 2010

SWEENEY, Colin L. et al. Methotrexate exacerbates tumor progression in a murine model of chronic myeloid leukemia. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 300, n. 3, p. 1075-1084, 2002.

SWEREV, Tatjana Maria; WIRTH, Thomas; USHMOROV, Alexey. Activation of oncogenic pathways in classical Hodgkin lymphoma by decitabine: A rationale for combination with small molecular weight inhibitors. **International Journal of Oncology**, v. 50, n. 2, p. 555-566, 2017.

SYNOWIEC, Ewelina et al. Doxorubicin differentially induces apoptosis, expression of mitochondrial apoptosis-related genes, and mitochondrial potential in BCR-ABL1-expressing cells sensitive and resistant to imatinib. **BioMed research international**, v. 2015, 2015

TACAR, Oktay; SRIAMORNSAK, Pornsak; DASS, Crispin R. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 65, n. 2, p. 157-170, 2013

TAKAHASHI, Koichi et al. Clofarabine Plus Low-Dose Cytarabine Is as Effective as and Less Toxic Than Intensive Chemotherapy in Elderly AML Patients. **Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia**, p. 2152-2650, 2015

TALLMAN, Martin S.; GILLILAND, D. Gary; ROWE, Jacob M. Drug therapy for acute myeloid leukemia. **Blood Journal**, v. 106, n. 4, p. 1154-1163, 2005

TALPAZ, et al. Re-emergence of interferon- α in the treatment of chronic myeloid leukemia. **Macmillan Publishers Limited**, n. 27, p. 802-12, 2013

VARDIMAN, James W. et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. **Blood Journal**, v. 114, n. 5, p. 937-951, jul. 2009

TANG, S. et al. DNA methylation-mediated epigenetic silencing of miR-720 contributes to leukemogenesis in acute myeloid leukemia. **Zhonghua xue ye xue za zhi= Zhonghua xueyexue zazhi**, v. 35, n. 11, p. 1009-1012, 2014

TANAKA, Satomi et al. Ezh2 augments leukemogenicity by reinforcing differentiation blockage in acute myeloid leukemia. **Blood**, v. 120, n. 5, p. 1107-1117, 2012.

TEFFERI, Ayalew et al. Frequent *TET2* mutations in systemic mastocytosis: clinical, KITD816V and FIP1L1-PDGFR α correlates. **Leukemia**, v. 23, n. 5, p. 900-904, 2009a.

TEFFERI, Ayalew et al. *TET2* mutations and their clinical correlates in polycythemia vera, essential thrombocythemia and myelofibrosis. **Leukemia**, v. 23, n. 5, p. 905-911, 2009b.

TURCAN, Sevin et al. Efficient induction of differentiation and growth inhibition in IDH1 mutant glioma cells by the DNMT Inhibitor Decitabine. **Oncotarget**, v. 4, n. 10, p. 1729-1736, 2013.

UEDA, Takeshi et al. Fbxl10 overexpression in murine hematopoietic stem cells induces leukemia involving metabolic activation and upregulation of Nsg2. **Blood**, v. 125, n. 22, p. 3437-3446, 2015.

VAN DAMME, Michaël et al. Characterization of TET and IDH gene expression in chronic lymphocytic leukemia: comparison with normal B cells and prognostic significance. **Clinical Epigenetics**, v. 8, n. 1, p. 132, 2016.

VERA-AGUILERA, Jesus et al. Bilateral orbital myeloid sarcoma preceding acute myeloid leukemia in an adult: a case report and review of the literature. **Journal of Medical Case Reports**, v. 10, n. 31, p. 1-5, 2016

VIJAYARAGHAVALU, Sivakumar; LABHASETWAR, Vinod. Efficacy of decitabine-loaded nanogels in overcoming cancer drug resistance is mediated via sustained DNA methyltransferase 1 (DNMT1) depletion. **Cancer letters**, v. 331, n. 1, p. 122-129, 2013.

VILLASBOAS, Jose C.; ANSELL Stephen M.; Recent advances in the management of Hodgkin lymphoma. **F1000 Research**, n. 5, p. 1-8, 2016

WANG, Eunice S. et al. Activity of a novel anti-folate (PDX, 10-propargyl 10-deazaaminopterin) against human lymphoma is superior to methotrexate and correlates with tumor RFC-1 gene expression. **Leukemia & lymphoma**, v. 44, n. 6, p. 1027-1035, 2003

WANG, Leo D., WAGERS, Amy J. Dynamic niches in the origination and differentiation of haematopoietic stem cells. **Nature Reviews: Molecular cell biology**, n. 12, v. 10, p. 643- 645, set. 2011

WELEDJI, Elroy Patrick; OROCK, George Enow. Surgery for non-Hodgkin's lymphoma. **Oncology Reviews**, v. 9, n. 274, p. 17-22, 2015

XU, Feng et al. Overexpression of the EZH2, RING1 and BMI1 genes is common in myelodysplastic syndromes: relation to adverse epigenetic alteration and poor prognostic scoring. **Annals of hematology**, v. 90, n. 6, p. 643-653, 2011.

XU, Lan et al. Genomic landscape of CD34+ hematopoietic cells in myelodysplastic syndrome and gene mutation profiles as prognostic markers. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 23, p. 8589-8594, 2014

YAN-FANG, Tao et al. The promoter of miR-663 is hypermethylated in Chinese pediatric acute myeloid leukemia (AML). **BMC medical genetics**, v. 14, n. 1, p. 74, 2013

YANG, Allen S. et al. DNA methylation changes after 5-aza-2'-deoxycytidine therapy in patients with leukemia. **Cancer research**, v. 66, n. 10, p. 5495-5503, 2006

YANG, Xiaojing et al. Targeting DNA methylation for epigenetic therapy. **Trends in pharmacological sciences**, v. 31, n. 11, p. 536-546, 2010

YAP, Damian B. et al. Somatic mutations at EZH2 Y641 act dominantly through a mechanism of selectively altered PRC2 catalytic activity, to increase H3K27 trimethylation. **Blood**, v. 117, n. 8, p. 2451-2459, 2011.

ZHANG, X. Y. et al. Potential mechanism and prognostic value of promoter methylation of PRDM1 gene in diffuse large B cell lymphoma. **Zhonghua bing li xue za zhi= Chinese journal of pathology**, v. 45, n. 12, p. 831, 2016

ZHAO, L.J. et al. Hepatitis C virus-related mixed cryoglobulinemic endocapillary proliferative glomerulonephritis and B-cell non-Hodgkin lymphoma: a case report and literature review. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, n. 19, p. 3050-3055, 2015

ZHEN, Chao Jie; WANG, Y. Lynn. Molecular Monitoring of Chronic Myeloid

Leukemia International Standardization of BCR-ABL1 Quantitation. **The Journal of Molecular Diagnostics**, v. 15, n. 5, p. 556-564, set. 2013

ZHOU, Jing-Dong et al. GPX3 methylation in bone marrow predicts adverse prognosis and leukemia transformation in myelodysplastic syndrome. **Cancer Medicine**, 2016

ZOGHBI, Huda; BEAUDET, Arthur. Epigenetics and Human Disease. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, p. 1-28, 2016